

Determinación del potencial alelopático de cultivares de arroz
(*Oryza sativa* L.) más frecuentemente empleados en la Mesopotamia

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires,
Área Producción Vegetal*

Alicia Florencia Urteaga Omar

Ingeniera Agrónoma - Universidad Nacional de Entre Ríos - 2005

Lugar de trabajo: Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNER)



Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Silvia Rosa Leicach

Licenciada en Química (Universidad de Buenos Aires)
Doctora en Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires)

Consejero de Estudios

Hugo Daniel Chludil

Farmacéutico

(Universidad Nacional de la Patagónica San Juan Bosco)

Doctor en Farmacia

(Universidad Nacional de la Patagónica San Juan Bosco)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Silvia Rosa Leicach

Licenciada en Química (Universidad de Buenos Aires)
Doctora en Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Javier Ramirez

Licenciado en Química (Universidad de Buenos Aires)
Doctor en Ciencias Químicas (Universidad de Buenos Aires)

JURADO

Antonio Guglielmini

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)
Doctor en Ciencias Agropecuarias (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 17 de ABRIL de 2012

A mi madre y a Hugo

A Maximiliano

A Francisco

Muchas personas e instituciones contribuyeron, de una u otra forma, a la concreción del presente trabajo. A todas ellas, y a los que me brindaron permanente e incondicional apoyo afectivo, mi sincero agradecimiento.

A.F.U.O.

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.”

A. Florencia Urteaga Omar

INDICE GENERAL

	Pág.
Indice General.....	vi
Indice de Cuadro.....	viii
Indice de Figuras.....	ix
Abreviaturas.....	xi
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiii
CAPITULO I. INTRODUCCION	1
1. <i>Oryza sativa</i>	2
1.1. Descripción botánica del arroz	2
1.1.1. Clasificación taxonómica	3
1.2. Origen del cultivo de arroz	3
1.3. El cultivo de arroz en Argentina. Situación actual	5
1.4. El arroz (<i>Oryza sativa</i> L.), una fuente de alimentación con historia	6
1.5. Interferencia entre organismos vegetales	8
1.5.1. Alelopatía cultivo-maleza	9
1.5.1.1. Bioensayos alelopáticos	10
1.5.2. Competencia cultivo-maleza	11
1.6. Motivación y significado de la investigación realizada	15
1.7. Objetivos, hipótesis y organización de la tesis	15
CAPITULO II. FASE I: IDENTIFICACIÓN DE CULTIVARES CON POTENCIAL ALELOPÁTICO.....	17
2.1. Alelopatía en arroz. Hacia el control biológico de las malezas.....	18
2.1.1. Interferencia química intra e interespecífica del arroz	18
2.2. Bioensayos para determinar alelopatía	20
2.3. Objetivos	21
2.4. Hipótesis	21
2.5. Materiales y métodos	21
2.6. Análisis de los datos	25
2.7. Resultados	25
2.8. Discusión de los resultados obtenidos en el RST	30
CAPITULO III. IDENTIFICACIÓN DE ALELOQUÍMICOS.....	31
3.1. Aleloquímicos. Algunas técnicas para su análisis.....	32
3.2. Aleloquímicos en arroz	33
3.3. Objetivo	40
3.4. Hipótesis	40
3.5. Instrumental, materiales y metodologías utilizadas	40
3.5.1. Obtención de material vegetal	40
3.5.1.1. Preparación de las muestras	41
3.5.2. Procesos separativos	41
a) Cromatografía en capa delgada	41
b) Cromatografía en columna	42

c) Extracción en fase sólida (EFS)	42
d) Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	42
e) Cromatografía gaseosa (CG)	42
3.5.3. Métodos espectroscópicos	42
a) Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	42
b) Espectrometría de masa (EM)	42
3.6. Análisis de los resultados	43
3.6.1. Análisis comparativo de extractos no polares de raíces	43
3.6.1.1. Resonancia magnética nuclear	43
3.6.1.2. Cromatografía gaseosa	43
3.6.2. Análisis de los extractos polares	54
3.7. Discusión	64
3.7.1. Componentes no polares	64
3.7.2. Componentes polares	65
CAPITULO IV. DISCUSION	68
4. Discusión general.....	69
CAPITULO V. CONCLUSIONES	74
5. Conclusiones	75
CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA	76
6. Bibliografía citada.....	77

INDICE DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1	Principales diferencias entre las subespecies indica y japónica (Adaptado de Acevedo et al., 2006)	3
Cuadro 2	Principales características de los cultivares de arroz probados	23
Cuadro 3	Número de raíces (n), medias (ordenadas en sentido descendente) y desvíos típicos correspondientes a la longitud radical de los capines en el grupo testigo y en los grupos experimentales	26
Cuadro 4	Análisis de la varianza de la longitud radical de los capines en función de las diferentes condiciones experimentales	28
Cuadro 5	Pruebas de comparación de medias de Tukey comparando la longitud radical de cada tratamiento	28
Cuadro 6	Aleloquímicos identificados en rastrojos de arroz, frescos y en descomposición	34
Cuadro 7	Aleloquímicos identificados en hojas y tallos de arroz	35
Cuadro 8	Aleloquímicos identificados en la raíz de arroz y en sus exudados	36
Cuadro 9	Aleloquímicos identificados en la cáscara del grano de arroz.	39
Cuadro 10	Valores medios de las masas de los extractos no polares (ciclohexano) y polar (metanol) expresados como porcentajes correspondiente al promedio de tres repeticiones ($\bar{x} \pm DE$)	43
Cuadro 11	Abundancias relativas (%) de los compuestos identificados en raíces ($\bar{X} \pm DE$).....	45
Cuadro 12	Valor medio, de tres repeticiones, de la masa de ácidos fenólicos (\bar{x} g .g ⁻¹ de raíz seca) ($\bar{X} \pm DE$).....	57
Cuadro 13	Valores de RMN ¹ H y ¹³ C observados comparados con datos bibliográficos correspondientes al sitosterol-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopiranosido.	61
Cuadro 14	Valores de RMN ¹ H y ¹³ C correspondientes a la momilactona B	63
Cuadro 15	Valores de desplazamiento químico de RMN- ¹ H y ¹³ C de la fracción C correspondientes a la momilactona A.....	64

INDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Morfología de la planta de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.).....	2
Figura 2	Dispersión geográfica del cultivo en función del área sembrada	5
Figura 3	Arroz rojo	12
Figura 4	Arroz rojo maduro.....	12
Figura 5	<i>Echinochloa crus-galli</i> maduro	14
Figura 6	Inflorescencia <i>Echinochloa crus-galli</i>	16
Figura 7	Crecimiento radical de los capines en presencia de un cultivar alelopático (izquierda), uno no alelopático (centro) y ninguno (derecha) durante el RST.	22
Figura 8	Plántulas de <i>E. crus-galli</i> que crecieron con El Paso 144 (izquierda) y capines que crecieron solos (derecha).....	25
Figura 9	Plántulas de capín que crecieron con Bluebonnet 50 (izquierda) y capines que crecieron solos (derecha)	26
Figura 10	Diagrama de caja de la longitud radical (cm) de los capines del grupo testigo (caja azul) y de los que crecieron en los distintos grupos experimentales (cajas naranja). Esta gráfica encierra el rango intercuartil de los datos en una caja que tiene la mediana representada mediante la rayita horizontal. El límite superior de cada caja corresponde al cuartil 3 (Q ₃) o percentil 75 (P ₇₅). El límite inferior corresponde al cuartil 1 (Q ₁) o percentil 25 (P ₂₅). Además de la caja, se prolongan extensiones, que muestran las observaciones extremas en la muestra	27
Figura 11	Dendograma que muestra los cuatro grupos jerárquicos de los distintos tratamientos (cultivares) utilizando como criterio de agrupamiento la distancia euclídeana	29
Figura 12	Estructuras de algunos aleloquímicos identificados en rastrojos de arroz frescos y ya en proceso de descomposición.	34
Figura 13	Compuestos diterpénicos y fenólicos aislados de hojas y tallos de arroz ...	35
Figura 14	Compuestos diterpénicos y derivados indólicos identificados en exudados de raíz y raíces de arroz.	37
Figura 15	Biosíntesis de las fitoalexinas de Arroz (adaptado de Toyomasu et al., 2008).....	38
Figura 16	Estructuras químicas de los Fitocasanos A-E	38
Figura 17	Derivado triterpenoidal identificado en cáscaras de arroz	39
Figura 18	Macetas preparadas con los tres cultivares de arroz	40
Figura 19	Perfiles cromatográficos (CG) de los extractos de ciclohexano no polares de raíces de a) Bluebonnet 50 b) El Paso 144 y c) Supremo13. (1) Heptadecano; (2) octadecanal; (3) octadecano; (4) nonadecano; (5) 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; (6) Hexadecanoato de metilo; (7) eicosano; (8) Ac. hexadecanoico; (9) Heneicosano; (10) 8-heptil pentadecano; (11) docosano; (12) tricosano; (13) Compuestos oxigenados	45
Figura 20	Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del heptadecano...	47
Figura 21	Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del octadecanal....	47

Figura 22	Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del octadecano....	48
Figura 23	Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del nonadecano...	48
Figura 24	Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del (6,10,14-trimetil)-2-pentadecanona.....	49
Figura 25	Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del hexadecanoato de metilo	49
Figura 26	Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del eicosano.....	50
Figura 27	Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del ácido hexadecanoico.....	50
Figura 28	Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del heneicosano...	51
Figura 29	Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del 8-heptil-pentadecano	51
Figura 30	Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del docosano.....	52
Figura 31	Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del tricosano.....	52
Figura 32	Análisis de componentes principales aplicado al promedio de la abundancia relativa de las tres repeticiones en los compuestos no polares en raíz de arroz	53
Figura 33	Perfiles cromatográficos de CLAR de los extractos metanólicos de raíz de a) Bluebonnet 50 b) El Paso 144 y c) Supremo 13.....	55
Figura 34	Cromatograma de CLAR (bajos tiempos de retención) de los extractos metanólicos de raíz de a) Bluebonnet 50 b) El Paso 144 y c) Supremo 13.	56
Figura 35	Análisis de Componentes Principales aplicado a los valores medios de los ácidos fenólicos identificados de raíces secas de los cultivares A, B y C.....	57
Figura 36	Derivados fenólicos identificados en los extractos metanólicos de raíz de los cultivares A, B y C.....	58
Figura 37	Cromatograma de CLAR (mayores tiempos de retención) de los extractos metanólicos de raíz de a) Bluebonnet 50 b) El Paso 144 y c) Supremo 13.....	59
Figura 38	Estructura química del β -sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido.....	61
Figura 39	Estructura química de las momilactonas A y B.....	62

ABREVIATURAS

C-18: extracción en fase sólida
 CC: cromatografía de columna
 ccd: cromatografía en capa delgada
 CDC₃: cloroformo deuterado
 CG: cromatografía gaseosa
 CG-EM: cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa
 CLAR: cromatografía líquida de alta resolución
 CLAR-EM: cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa
 COSY: (del inglés Correlation spectroscopy) espectroscopía de correlación protón-protón
 d: doblete
 d.i.: diámetro interno
 dd: doblete
 EM: espectro de masa
 HMBC: (del inglés Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) coherencia cuántica simple heteronuclear
 Hz: hertz
 IR: Espectroscopía infrarroja
 IRR: International Rice Research Institute
 m: multiplote
m/z: relación masa-carga
 MHz: megahertz
 mm: milímetro
 NILs: (del inglés Near Isogenic Lines) líneas isogénicas cercanas
 nm: nanómetro
 NOESY: (del inglés Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) espectroscopía por efecto nuclear Overhauser
 ppm: partes por millón
 QTLs: (del inglés Quantitative Trait Locus) loci de rasgos cuantitativos
 R_f: relación de frente
 RMN ¹³C: resonancia magnética nuclear de carbono-13
 RMN ¹H: resonancia magnética nuclear de protón
 RST: Relay Seeding Technique
 s: singulete
 t: triplete
 TMS: tetrametilsilano
 tn/ha: toneladas por hectárea
 TOCSY: (del inglés Total Correlation Spectroscopy) espectroscopía totalmente correlacionada
 uma: unidades de masa atómica
 UV: ultravioleta
 ??:desplazamiento químico
 ?g: microgramo
 ?mol: micromol

RESUMEN

Urteaga Omar, AF (2011) Determinación del potencial alelopático de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) más frecuentemente empleados en la Mesopotamia. *Tesis de Maestría en Producción Vegetal*. Facultad de Agronomía. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.

El arroz (*Oryza sativa* L.) es una especie cultivada en todo el mundo y las malezas constituyen uno de los principales factores que afectan su producción. El conocimiento del potencial alelopático de los diferentes cultivares regionales resulta fundamental en términos de posibles estrategias para el control de las mismas. Se evaluó el potencial alelopático en cultivares de arroz utilizados en la Mesopotamia argentina frente a *Echinochloa crus galli* L. A través de boiensayos RST (Relay Seeding Technique) se determinó que los cultivares El Paso 144 (EP) y Bluebonnet 50 (BB) presentaron mayor bioactividad que Cambá, Yeruá, Irga 147 y Supremo 13. Los posibles aleloquímicos relacionados al potencial inhibitorio fueron evaluados en las raíces de los dos cultivares fuertemente activos (EP) y (BB) y el menos bioactivo (Supremo 13). Mediante técnicas cromatográficas (CG y CLAR) y espectroscópicas (RMN ^1H y ^{13}C y EM) se determinó la presencia de hidrocarburos, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y sus ésteres metílicos en los extractos no polares. Los cultivares alelopáticos (BB y EP) presentaron mayor proporción de compuestos oxigenados que el no alelopático (Supremo 13). Se informa por primera vez la cetona 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona en un cultivar de arroz alelopático. Todos los cultivares de arroz produjeron los ácidos cafeico, vanílico, siríngico, ferúlico y *p*-cumárico, siendo la concentración de este último mayor en los alelopáticos. En los extractos metanólicos de los cultivares alelopáticos se determinó la presencia del 3-O-?-D-glucopiranosido de sitosterol y de las momilactonas A y B que fueron caracterizadas por técnicas espectroscópicas. Estos resultados son los primeros en relación al cultivo de arroz en Argentina y tienen utilidad potencial en el control de malezas, en términos del manejo sustentable de los agroecosistemas arroceros.

Palabras clave: cultivares de arroz, *Echinochloa crus-galli*, alelopatía, aleloquímicos, metabolitos secundarios, análisis cromatográfico, RMN- ^1H (espectroscopía de resonancia magnética nuclear).

ABSTRACT

Urteaga Omar, AF (2011) Determination of allelopathic potential of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars most frequently employed in Argentinean mesopotamia. *Tesis de Maestría en Producción Vegetal*. Facultad de Agronomía. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.

Rice (*Oryza sativa* L.) is a cultivated species worldwide and weeds are one of the main factors affecting its production. Knowledge on the allelopathic potential of the different regional cultivars is essential in terms of alternative strategies for their control. The allelopathic potential in rice cultivars used in Argentinian Mesopotamia against *Echinochloa crus galli* L. was evaluated. The Relay Seeding Technique was used to determine that El Paso 144 (EP) y Bluebonnet 50 (BB) cultivars presented higher inhibition capacities than Cambá, Yerúa, Irga 147, and Supremo 13. Potential allelochemicals related to the inhibitory activity were evaluated at the roots of the two cultivars highly active (EP and BB), and the less bioactive (Supremo 13). Chromatographic (CG y CLAR) and spectroscopic techniques (RMN ¹H and ¹³C y EM), were used to determine the presence of hydrocarbons, aldehydes, ketones, carboxylic acids and their methylated esters in the non-polar extracts. Allelopathic cultivars (BB and EP) exhibited greater proportions of oxygenated compounds than the non-allelopathic one. The ketone 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone is reported for the first time in an allelopathic rice cultivar. All studied cultivars produced caffeic, vanillic, siringic, ferulic, and *p*-coumaric acids, but the concentration of the latter being higher in allelopathic cultivars. Sitosterol 3-*O*- β -D-glucopiranoside, and momilactones A and B were characterized in allelopathic cultivars by means of spectroscopic techniques. These results are the first reported for Argentinean rice cultivars, and are potentially useful in weed management in terms of sustainable rice ecosystems.

Key words: rice cultivars, *Echinochloa crus-galli*, allelopathy, allelochemicals, secondary metabolites, chromatographic analysis, RMN-¹H (nuclear magnetic resonance spectroscopy).

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1. *Oryza sativa*

1.1. Descripción botánica del arroz

El arroz es una planta de tallos cilíndricos, con nudos y entrenudos, hojas adheridas a los nudos, panícula terminal y adaptada para crecer en terrenos inundados. Las raíces son delgadas, fibrosas, fasciculadas y, a medida que crece la planta, se tornan alargadas y flácidas, con ramificaciones abundantes. La longitud del tallo va desde 30-50 cm (en variedades enanas, que son las que se cultivan en mayor escala), a 70 cm, en variedades gigantes. El macollaje se inicia en el primer nudo. Las hojas son alternas y dispuestas a lo largo del tallo. La primera que aparece, que carece de límina, se denomina prófalo; las restantes, son completas. La panícula, localizada sobre el extremo apical del tallo, se inicia sobre el último nudo denominado ciliar. Es una inflorescencia con un eje llamado raquis, que se extiende desde el nudo ciliar hasta el ápice. Según el tipo, se clasifica en abierta, compacta o intermedia, y según el ángulo de inserción de las ramificaciones primarias, puede ser erecta o colgante (Dimitri, 1987).



Figura 1. Morfología de la planta de arroz (*Oryza sativa* L.)

Fuente: www.gastrosoler.com/los_arroces_.htm

Las flores están formadas por 6 estambres y un pistilo, donde el ovario de cavidad simple, contiene el óvulo. El grano es una cariósipide donde se encuentra la semilla, adherida a la parte del ovario maduro. El grano está formado por la cáscara, que a la vez está formado por glumas, glumelas, raquis y arista. El pericarpio varía en espesor, tiene una consistencia fibrosa y está formado por la cutícula, el mesocarpio y una capa de células entrecruzadas. La testa constituye la cubierta de la semilla y el endospermo (la mayor parte del grano) está formado por sustancias almidonosas (Dimitri, 1987).

1.1.1. Clasificación taxonómica

El arroz es una gramínea autógama, de gran talla, que crece con mayor facilidad en los climas tropicales. Originariamente era una planta cultivada en secano, pero por mutaciones se convirtió en semi-acuática. Si bien puede crecer en medios bastante diversos, lo hace más rápidamente y con mayor vigor en un medio cálido y húmedo. Es una Fanerógama, de la familia *Poaceae* o *Gramineae*, del género *Oryza* L. Arroz, Tribu: *Oryzae* (Gramene, 2010).

1.2. Origen del cultivo de arroz

Posiblemente sea la India el país donde se cultivó el arroz por primera vez, debido a que allí abundaban los arroces silvestres. Aunque el desarrollo del cultivo también se dio en China, tanto en tierras bajas como altas. Por lo que es posible que haya habido varias rutas por las que se introdujo el arroz de Asia a otras partes del mundo. Los últimos hallazgos arqueológicos han puesto al descubierto glumas de arroz que podrían datarse entre los años 2750 y 3280 A.C. (en yacimientos chinos) y hasta 3.500 años A.C. (en excavaciones tailandesas). De este modo, la extendida creencia de que el *Oryza sativa* era de origen indio y podía datarse alrededor de unos 2500 años A.C., ha quedado desplazada (Cabezas Bolaños y Espinoza Esquivel, 2000).

Según Dalrymple (1986) se registran dos especies de arroz cultivadas, *Oryza sativa* y *Oryza glaberrima*. La primera es originaria de Asia y está ampliamente difundida por todas las regiones tropicales y templadas del mundo, mientras que la segunda tiene a África Occidental como su centro de origen y está siendo paulatinamente sustituida por el arroz asiático. Acevedo et al. (2006), señalan que a partir del proceso evolutivo y de domesticación a que se sometió a la especie *Oryza sativa*, surgieron innumerables tipos genéticamente divergentes los cuales se fueron adaptando a las más variadas condiciones agroecológicas, estando la especie actualmente subdividida en dos principales subespecies, grupos o razas eco geográficas (índica y japónica).

Caracteres	Indica	Japónica
Forma y color de la hoja	Larga y verde clara	Estrecha y verde oscura
Angulo (hoja bandera y tallo)	Agudo	Abierto
Forma del grano	Largo y fino	Largo y redondo
Arista	Fina y corta	Gruesa y larga

Cuadro 1. Principales diferencias entre las subespecies indica y japónica (Adaptado de Acevedo et al., 2006)

El grupo Indica es el principal grupo cultivado en el sur y sudeste de Asia y en muchas áreas de la República China. Morfológicamente, se caracteriza por poseer tallos largos, alta capacidad de macollaje, hojas largas, decumbentes, y ciclo tardío. El grupo Japónica es extensamente cultivado en las zonas templadas de Taiwán, Corea, Japón, parte de Australia, California, Europa y Egipto. Posee tallos cortos y rígidos, mediana capacidad

de macollaje, hojas oscuras, erectas, y ciclo precoz (Slaton, 2004). Se considera que, posiblemente, el arroz de tipo japónica haya sido domesticado en el sur de China o en el norte del sudeste asiático, e introducido a partir del siglo I desde China a Corea, y de Corea a Japón (Khush, 1997). Además de los aspectos destacados en el Cuadro 1, se suelen emplear otros caracteres para diferenciar ambos grupos, tales como la sensibilidad a la temperatura y la tolerancia a la sequía. En este sentido, McDonald (1994) encontró que, a diferencia de los índica, los cultivares japónica crecen predominantemente en regiones templadas y que las temperaturas bajas (entre 15°C y 20°C) no afectan su germinación ni su crecimiento vegetativo.

El género *Oryza* comprende 23 especies conocidas con diez tipos de genomas (A, B, BC, C, CD, E, F, G, HJ, HK), entre diploides y tetraploides (Ge et al., 1999), distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, siendo *Oryza sativa* y *Oryza glaberrima* las únicas cultivadas. Para aumentar los rendimientos del cultivo los programas de mejoramiento han acudido a la diversidad intraespecífica de *Oryza sativa* lo que ha generado la mayoría de las variedades existentes. Recientemente se ha explorado la diversidad interespecífica dentro del genoma A (Brondani et al., 2002) y en menor proporción especies con genomas diferentes al A incluyendo las especies tetraploides que, aunque son difíciles de cruzar, han originado líneas con caracteres de interés (Mariam et al., 1996; Multani et al., 2003).

En América Latina se han identificado cuatro especies silvestres de las cuales una es diploide con genoma A (*Oryza Glumaepatula*) y tres tetraploides con genoma CD (*Oryza alta*, *Oryza latifolia* y *Oryza grandiglumis*). De estas especies silvestres se han aprovechado características de resistencia (Multani et al., 2003) y se ha logrado la identificación de loci de rasgos cuantitativos (QTLs, del inglés Quantitative Trait Locus) y la producción de líneas isogénicas cercanas (NILs, del inglés Near Isogenic Lines). Sin embargo, el número de accesiones es pequeño para la mayoría de los países, excepto para Brasil (Buso et al., 2001) y Costa Rica (Zamo ra et al., 2003).

Giarroco et al. (2007) estudiaron la mayoría de los cultivares de arroz de Argentina (los progenitores de los modernos cultivares comerciales, líneas de cría, y materiales que tienen rasgos de particular interés para el mejoramiento del arroz) inscriptos en el Registro de la Propiedad Nacional de Semillas (INASE) y lanzados en las últimas seis décadas. Informaron que la mayoría de las variedades argentinas entran en el grupo japónica e identificaron dos subgrupos que corresponden a los subtipos templados y tropicales. Los cultivares agrupados en el subgrupo japónica templado, derivados de genotipos italianos, tienen granos largo-ancho, medio-ancho, medio o corto y fueron criados en las regiones templadas que se sitúan entre los 30° y los 33° de latitud sur, en las provincias de Entre Ríos y Santa Fe. Los cultivares agrupados en el subgrupo japónica tropical, sobre todo los de grano largo-fino, fueron criados en las regiones subtropicales situadas entre los 25° y los 30° de latitud sur, en las provincias de Formosa, Chaco y Corrientes. El grupo de japónica tropical incluye los cultivares de grano largo introducidos desde Estados Unidos y, finalmente, el grupo de cultivares índicas se compone de plantas introducidas desde diferentes lugares del mundo, centros nacionales o internacionales.

1.3. El cultivo de arroz en Argentina. Situación actual

El arroz es uno de los principales productos farináceos producidos y exportados por Argentina. Los principales destinos de las exportaciones son Brasil, Chile, Irán, Bolivia, Turquía y Haití. En la mesopotamia argentina existen muy buenas condiciones agroecológicas para su cultivo; la producción es eficiente y las áreas de cultivo están cercanas a los puertos de salida de las exportaciones. El sector productivo tiene un elevado nivel de integración vertical y horizontal, cuenta con alta tecnología, organizaciones innovadoras y financiadas por el propio sector. En la actualidad se registra un crecimiento de la demanda de especialidades (aunque son nichos de poco volumen), de productos con valor agregado y orgánicos. Los principales rubros producidos son arroz con cáscara, arroz elaborado, arroz partido, salvado de arroz y arroz parborizado.

La producción nacional de arroz se concentra en el litoral argentino, siendo las provincias de Entre Ríos y Corrientes las más representativas. Históricamente, Entre Ríos fue superior en superficie sembrada y producción que Corrientes, pero en los últimos años esta situación se ha revertido.

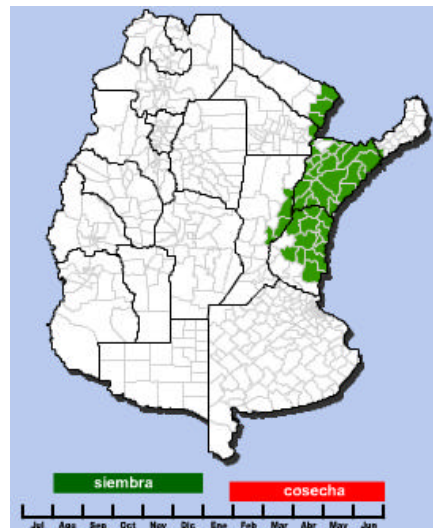


Figura 2. Dispersión geográfica del cultivo en función del área sembrada

Fuente: www.minagri.gob.ar/SAGPyA/agricultura

La superficie sembrada a nivel nacional (2010-2011) es de 255.550 hectáreas, lo que muestra un crecimiento del 15%, representando un aumento de 34.010 has con respecto a la campaña pasada. Corrientes presenta el 40,8% del área total, seguido por Entre Ríos y Santa Fe con el 36,8% y 16,4%, respectivamente, por Formosa con el 3,4% y Chaco con el 2,6% (Asociación Correntina de Plantadores de Arroz, 2010). Se estima una producción de 1.661.075 toneladas de arroz con cáscara. Cabe destacar que el recurso agua, por el costo y por la importancia que tiene un buen manejo del riego en la producción final, es determinante en la capacidad de crecimiento del sector arrocero. Los volúmenes de agua requeridos por el cultivo se proveen de diferente manera según la zona productora: en Entre Ríos el riego se realiza con agua de pozo y represa, mientras que en Corrientes por medio de represas o bombeo de agua de río.

Para la campaña 2010-2011, Entre Ríos informó una superficie sembrada de 92.000 ha, a ser regadas con agua de 60 represas y del acuífero subterráneo (Bolsa de Cereales de Entre Ríos, 2010). De un total de 260 productores arroceros censados en esta provincia (concentrados en los departamentos de Villaguay y San Salvador), sólo el 6% siembra más de 1000 ha, mientras que el 66% siembra menos de 200 ha (Carñel, 2008). Por su parte, Corrientes informó una superficie sembrada de 104.000 ha, lo que representa un 31,8% más que la campaña 2009-2010 y marca un record histórico. Este incremento en la superficie de cultivo se debió a que pudo concretarse la intención de siembra por contar con una oferta de agua suficiente en las represas como para satisfacer las necesidades de riego. El mayor aumento corresponde a las zonas centro, sur, y costa del Río Uruguay, caracterizadas por contar con riego desde represas en la mayoría de las explotaciones que la integran. Aproximadamente una docena de empresas siembran el 54% del área, la mayoría de ellas ubicadas en el sudeste de la provincia (departamentos de Mercedes, Curuzú Cuatiá y Monte Caseros), la región más apta para el cultivo. Otra zona que ha mostrado una reciente recuperación es la zona norte, sobre la costa del río Paraná, la más antigua de las zonas arroceras correntinas, donde grandes empresas han realizado nuevas inversiones para adoptar tecnologías (como la nivelación cero) que les permitan superar las limitaciones de los suelos y lograr un cultivo rentable.

En Argentina, el sistema de producción de arroz es a través de siembra directa sobre suelo seco y luego irrigado. Si el terreno destinado al arroz proviene de campos naturales la preparación de la tierra comienza en el verano anterior; si proviene de agricultura (soja, arroz u otro), el laboreo comienza en febrero o marzo. En el caso de la soja es posible hacer una preparación mínima que consiste en la construcción de taipas (bordo o melgas en contorno). Luego del laboreo, se nivela el terreno marcando curvas a nivel cero con láser con una diferencia entre taipas entre 4 y 8 cm. Actualmente, las taipas se construyen de 20 a 30 cm de alto y 60 a 100 cm de ancho, dado que no es necesario manejar láminas altas de agua. La siembra por lo general se hace con sembradoras de discos con una distancia de 15 a 21 cm entre hileras. El período de siembra comienza a mediados de septiembre y se extiende hasta mediados de diciembre. A la siembra se aplican los fertilizantes de base N, P, K y luego se realiza una fertilización con N previo al riego y otra en diferenciación. Las malezas se controlan con herbicidas al inicio de macollaje y, por lo general, no hace falta efectuar controles de enfermedades o de insectos. El riego o inundación también comienza a inicio del macollaje y el cultivo permanece inundado hasta al fin del ciclo, cerca de la madurez. La cosecha es mecánica, con el suelo saturado o muy húmedo lo que genera grandes huellas por los tractores y carros utilizados para transportar el cereal dentro del lote o chacra. Es frecuente que el rastrojo sea aprovechado para el pastoreo directo, aunque también se siembran pasturas con avión o se quema parcialmente y se laborea inmediatamente (Quintero, 2010).

1.4. El arroz (*Oryza sativa* L.), una fuente de alimentación con historia

Por cientos de años el arroz ha estado entre los cultivos más importantes del planeta y actualmente sigue siendo la principal fuente de alimentación de más de la mitad de la población mundial (Gealy y Moldenhauer, 2005). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos sostenidos por aumentar la calidad y cantidad del arroz producido, las malezas siguen siendo el principal escollo (Olofsdotter, 2001), aún cuando se usen químicos y métodos culturales para su control.

Antes de la introducción de los herbicidas selectivos, los productores realizaban ciertos procedimientos para controlar las malezas, y al mismo tiempo para proteger a los cultivos, tales como la utilización de rotación y barbechos. Como lo señalan Kudsk y Streibig (2003), la introducción de herbicidas selectivos a finales de 1940 y la constante aparición de nuevos herbicidas en las sucesivas décadas proporcionó a los productores nuevas herramientas (desmalezadores químicos), permitiéndoles considerar el control de malezas de forma más independiente del sistema de producción de cultivos. En la década de los años 1980, se hicieron públicos los efectos secundarios de los herbicidas sobre el ambiente y la salud humana, lo que exigió el cumplimiento de requisitos cada vez más exigentes y de políticas para reducir su uso. Estas medidas han contribuido a que el control integrado de malezas haya adquirido el estatus de concepto guía y a frenar, en alguna medida, la introducción permanente de nuevos herbicidas al mercado. Hoy en día los productores también tienen la opción de utilizar cultivos resistentes a herbicidas, que en el caso específico del arroz, queda reflejado en el reciente desarrollo de algunos cultivares resistentes a un amplio espectro de químicos, especialmente a imidazolinonas y glifosato (Olofsdotter et al., 2000).

La introducción de arroces resistentes a herbicidas ha proporcionando algunas ventajas a los productores de arroz (Olofsdotter et al., 2000), tales como: a) control selectivo de malezas, b) control de malezas resistentes a los herbicidas tradicionales, c) control post emergente más eficiente. Ha permitido, también, recuperar áreas para la producción de arroz que habían sido abandonadas por estar fuertemente infestadas por malezas. Asimismo, ha contribuido a aumentar el tiempo de rotación, reduciendo el consumo de materias fósiles del suelo, promoviendo el reemplazo de herbicidas tradicionales por productos más benignos desde el punto de vista medioambiental, y logrando producir más arroz sin agregar nuevas tierras a la producción.

Sin embargo, existen problemas acerca del impacto de estos arroces resistentes a herbicidas sobre las malezas. Uno de los principales inconvenientes es la posibilidad de una rápida transferencia del rasgo resistente a malezas compatibles con las especies de arroz. Rajguru et al. (2005) confirmaron experimentalmente el flujo de genes desde los arroces resistentes a imidazolinonas hacia las plantas de arroz rojo, transformándolas en resistentes; mientras Chen et al. (2004) habían advertido previamente que escapes transgénicos por flujo de genes desde semillas genéticamente modificadas a sus parientes silvestres, podrían causar problemas de bioseguridad ambiental. El desarrollo de poblaciones de malezas resistentes a herbicidas podría limitar sustancialmente, en un futuro próximo, las opciones agroquímicas para manejar malezas por parte de los chacareros. A su vez, el arroz resistente a herbicidas también podría transformarse en un factor problemático al aumentar la presión de selección hacia biotipos de malezas resistentes (Kudsk y Streibig, 2003). En una revisión sobre el uso de herbicidas en Japón, Matsunaka (2001) presenta una comparación económica entre el control manual de malezas y el uso de herbicidas, y advierte sobre la proliferación de malezas resistentes a los herbicidas que se utilizan en el cultivo de arroz.

Tales inconvenientes han llevado a los especialistas (Karim et al., 2004), a efectuar recomendaciones en el sentido que el lanzamiento de arroces resistentes a herbicidas debería depender de una cuidadosa evaluación del riesgo, especialmente en áreas infestadas con malezas co-específicas del arroz o malezas inter cruzadas con *Oryza sp.* Desde la óptica

de Olofsdotter et al. (2000), las regulaciones previas a la comercialización de variedades de arroz resistentes a herbicidas, deberían balancear los riesgos y beneficios basados en las necesidades y condiciones locales. Por su parte, Chen et al. (2004) señalan que las variedades resistentes a herbicidas deberían considerarse como componentes del manejo integrado de malezas, conjuntamente con el uso racional de herbicidas y control de malezas en arroz, para prevenir la pérdida de esta nueva herramienta.

El interés por reducir el uso de herbicidas y por disminuir los costos de producción ha estimulado, además, el empleo de sustancias que aumentan la capacidad desintoxicante de los cultivos frente a los herbicidas, sin comprometer el control eficiente de las malezas (Fargo et al., 1994). Productos comerciales de este tipo se utilizan en la protección de cultivos extensivos, como maíz, sorgo granífero y arroz, contra aplicaciones en presiembra y preemergencia de herbicidas de las familias de los tiocarbamatos y cloroacetanilidas, sulfonilureas, imidazolinonas, ciclohexadionas, isoxazoles y triketonas. Hatzios y Burgos (2004) sugieren que estos productos inducen cofactores como el glutatión y enzimas desintoxicantes, como glutatión *S*-transferasa, citocromo P450 monooxigenasa y glucosil transferasas, aumentando el transporte vacuolar de los conjugados de glucosa de los herbicidas selectivos.

Con respecto al desarrollo de cultivares de arroz con características inhibitorias, los estudios de Gibson et al. (2002), demuestran que aplicaciones coordinadas de herbicidas en combinación con el potencial supresivo de los cultivos mejoran el control de malezas y optimizan el uso de herbicidas. A su vez, concluyen remarcando que el éxito de esta integración (herbicida-cultivo), depende de la duración de la competencia entre arroz y maleza.

1.5. Interferencia entre organismos vegetales

La interferencia entre plantas puede ocurrir en forma intraespecífica (entre individuos de la misma especie) o interespecífica (entre individuos de especies diferentes). Harper (1961, 1964) propuso el empleo del término interferencia para describir en una comunidad vegetal, el conjunto de interacciones entre plantas, resultante de la proximidad con sus vecinas. En tanto que Muller (1969) definió dos componentes como responsables de la interferencia: la competencia y la alelopatía o interferencia química. Describió competencia como el proceso a través del cual una planta utiliza recursos esenciales (luz, agua y nutrientes) a un nivel que limita el crecimiento de las que comparten su hábitat, y alelopatía como la capacidad de los organismos vegetales de liberar sustancias que influyen en el crecimiento y distribución de sus vecinos. En términos de Ricklefs (1998), la competencia es la sustracción de recursos compartidos, mientras que la alelopatía está relacionada con la adición de sustancias químicas al medioambiente.

En algunos casos, la competencia puede ser el factor predominante en la interferencia, mientras que en otros, puede serlo la alelopatía (Bais et al., 2003). No obstante, en la mayoría de los casos, la interferencia observada es producto de la contribución de ambos mecanismos (Einhellig, 1995; Mattice et al., 2001; Jennings y Nelson, 2002; Kong et al., 2006; Leicach, 2006).

1.5.1. Alelopatía cultivo-maleza

El término alelopatía tiene sus orígenes en la Grecia antigua y proviene de “allos” (mutuo) y “pathos” (enfermedad). Rice (1984) definió a la alelopatía como el efecto de una planta sobre el crecimiento de otra a través de la liberación de compuestos químicos. En el ámbito de la fisiología vegetal fue empleado por primera vez en 1937 por el vienés Hans Molisch, para explicar los efectos del etileno sobre la maduración de las frutas. Molisch lo utilizó de manera general para abarcar todos los efectos (inhibitorios y/o estimulantes) resultantes de la acción de los principios químicos provenientes de un organismo vegetal sobre otro, incluyendo en su definición tanto organismos inferiores (algas, hongos y bacterias), como plantas superiores.

La definición de alelopatía ha ido variando en relación a las interacciones químicas que incluye. Si bien algunos autores (Rice, 1984) han empleado el término para referirse sólo a los efectos negativos de una planta sobre otra (inhibición de la germinación y/o crecimiento), autores posteriores lo han empleado para describir tanto las interacciones positivas (promoción de los mismos) como las negativas, posición aceptada por la International Allelopathy Society en 1998, para microorganismos y plantas superiores. Mientras que la competencia por recursos sólo se manifiesta cuando la densidad de la población vegetal supera cierto valor y aumenta proporcionalmente a ésta, el grado de inhibición, debido a interferencia química, disminuye con el aumento de la densidad vegetal. Weidenhamer et al. (1989) han señalado que frente a una concentración dada, a medida que aumenta el número de plantas disminuye la cantidad de toxina absorbida por planta, diluyendo, de esta manera, el nivel de inhibición. En general, las fitotoxinas perjudican a organismos de la misma o de diferentes especies. Por encima de cierto valor de concentración, el efecto negativo se incrementa hasta que la planta que la absorbe muere; a baja concentración de toxinas, puede haber poca inhibición e, incluso, puede darse estimulación (Rice 1984; Liu y Lovett, 1993; Liu et al., 2005; Leicach, 2006).

Las sustancias con potencial alelopático (responsables de la interferencia química) son conocidas como aleloquímicos (Whittaker y Feeny, 1971) y están virtualmente presentes en todas las plantas, incluyendo tallos, hojas, raíces y semillas. La planta que libera aleloquímicos es reconocida como “donante” y la planta que es influenciada por la liberación de tales aleloquímicos es identificada como “receptora” (Inderjit y Duke, 2003). Para que los aleloquímicos actúen sobre la planta receptora deben ser liberados por la planta donante a través de alguno de los siguientes procesos: a) exudados de tallos y hojas transportados por el agua de lluvia (lixiviación); b) liberación de aleloquímicos volátiles desde las partes aérea (volatilización); c) liberación de compuestos fitotóxicos desde materiales vegetales en degradación (descomposición de restos vegetales); d) liberación de fitotoxinas por raíces (exudados radicales).

Entre los aleloquímicos conocidos se encuentran ácidos fenólicos, flavonoides, terpenoides, alcaloides y quinonas, entre tantos otros. Muchas sustancias químicas asociadas con la actividad alelopática de las plantas son metabolitos secundarios resultantes de las vías metabólicas del shikimato y acetato (Rice, 1984; Einhellig, 1995; Olofsdotter et al., 2002). Se supone que la actividad alelopática se basa en la acción conjunta de diferentes metabolitos secundarios que podrían actuar aditiva, sinérgica o antagónicamente (Chung et al., 2001; Inderjit et al., 2002; Weston y Duke, 2003; Seal et al., 2004a).

Mediante la búsqueda e identificación de aleloquímicos es posible desarrollar cultivares potencialmente alelopáticos a través de metodologías tradicionales o de manipulaciones genéticas. El carácter alelopático de un cultivar puede ser empleado en el manejo de las malezas de dos maneras diferentes: seleccionando la variedad apropiada del cultivo para incorporarle el carácter alelopático y trabajando directamente con un cultivo alelopático, o bien sembrando en la modalidad de siembra directa luego del cultivo de otra especie con actividad alelopática. A través de la primera opción los nuevos cultivares podrían transformarse en importantes herramientas para el control integrado de malezas (Chon y Kim, 2004), permitiendo que los productores dependan cada vez menos de los herbicidas sintéticos, lo mismo ocurriría intercalando en la rotación una variedad alelopática que deje rastrojos en el campo con capacidad para controlar malezas y enfermedades.

En el caso específico del arroz (*Oryza sativa* L.), es sabido que a pesar del empleo sostenido de herbicidas, las malezas siguen siendo un problema para los productores, ya que algunas han evolucionado hasta volverse resistentes (Gealy et al., 2003). De allí que el estudio de las propiedades alelopáticas del arroz se revela como una promisoriosa línea de investigación por su impacto benéfico sobre la conservación de la biodiversidad y la estabilidad del ecosistema. En este sentido, la identificación, y posterior aprovechamiento de las sustancias alelopáticas de los cultivares de arroz más frecuentemente usados en Argentina, podría contribuir a la reducción progresiva del uso de herbicidas en el manejo de malezas, fomentando una agricultura sustentable y en armonía con el ambiente. Sobre estas consideraciones se asienta la presente investigación.

1.5.1.1. Bioensayos alelopáticos

En condiciones de campo es difícil separar los efectos de la competencia respecto de los de la alelopatía (Chung et al., 2003). Si bien desde la perspectiva de un productor, no importa realmente si la reducción del rendimiento es causada por la competencia o la alelopatía, desde una perspectiva científica, es importante diferenciarlos. Por tal motivo se han desarrollado varias técnicas de laboratorio para medir alelopatía independientemente de la competencia, tales como el stair-step (Liu y Lovett, 1993), el test de cultivo hidropónico (Einhelling et al., 1985), el método de extracción en agua (Ahn y Chung, 2000; Kaworu, 2001) y la selección en un medio de agar (Wu et al., 1999). Estos bioensayos, que a continuación se caracterizan sintéticamente, han arrojado resultados similares tanto a campo como en laboratorio. En la técnica stair-step (o arreglo escalonado), la planta dadora se cultiva separada de la especie receptora, en macetas con suelo o arena en las que se agrega la solución nutriente, se lava el sistema y el lixiviado es usado para regar plantas de la especie receptora. El recipiente que contiene al dador está conectado al que contiene al receptor, y la solución de nutrientes circula en forma cíclica, impulsada por una bomba. En el test de cultivo hidropónico se cultivan las plantas dadoras y receptoras en hidroponía sin adición de nutrientes. La concentración de los aleloquímicos se puede variar, aumentando la cantidad de plantas dadoras, mientras que la cantidad de plantas receptoras se mantiene constante. En el método de extracción en agua se maceran durante distintos períodos y a temperaturas de 26 ± 2 °C diferentes partes de la planta, y la solución resultante se utiliza para regar las semillas de la especie receptora que se colocan en cajas de Petri. Finalmente, en la selección en un medio de agar, las semillas de la especie receptora se colocan en cajas

de Petri que poseen un medio agar que contiene a las semillas trituradas de la especie dadora.

Para el caso específico del arroz se han desarrollado diferentes bioensayos para probar interferencia química, entre ellos el conocido como RST, del inglés Relay Seeding Technique (Navarez y Olofsdotter, 1996). Se trata de un método rápido y económico relacionado con la germinación y crecimiento radical de la plántula, que permite analizar simultáneamente numerosos cultivares de arroz (Khanh et al., 2007) y asegura que las diferencias observadas en crecimiento no se deben a competencia por luz, agua o nutrientes (Jensen et al., 2001).

1.5.2. Competencia cultivo-maleza

La competencia puede surgir cuando dos plantas utilizan un mismo recurso cuya oferta es limitada. Esta reducción de la oferta puede afectar el crecimiento, la reproducción e, incluso, la supervivencia de la planta (Weston y Duke, 2003). En un entorno de oferta insuficiente, cuando la disponibilidad de un recurso común cae por debajo de los requerimientos conjuntos de las plantas, una manera sencilla de asegurarse la sobrevivencia es inhibir el crecimiento de plantas competitivas, disminuyendo el consumo de recursos escasos por parte de los competidores.

Ni et al. (2000) señalan que la biomasa inicial, la tasa de crecimiento y el índice de área foliar, constituyen los mejores predictores de la capacidad competitiva de los cultivos contra las malezas. Mientras que la tasa de crecimiento relativo, la tasa neta de asimilación y la capacidad de asimilación, son parámetros que confieren menor habilidad competitiva a los cultivos (Ni et al., 2000). De acuerdo con Zhao et al. (2006), el desarrollo de cultivares más competitivos respecto de las malezas, requiere del empleo de simples protocolos de selección basados preferentemente en rasgos que puedan ser medidos en condiciones libres de malezas. Al analizar los resultados de 40 cultivares de arroz que crecieron en condiciones aeróbicas en dos ambientes diferentes (uno libre de malezas y otro enmalezado), Zhao et al. (2006) concluyeron que el rendimiento y el vigor inicial en condiciones libres de maleza, pueden ser incluidos en un índice de selección indirecto que llegaría a explicar el 48% de las variaciones en biomasa y hasta un 89% del rendimiento.

La evidencia empírica muestra diferentes patrones comportamentales del arroz cultivado, en función de la maleza con la que debe competir. Entre las principales malezas del cultivo de arroz en el mundo, se destacan el arroz rojo y el capín (*Echinochloa sp.*).

El arroz rojo (que es un poco más alto, produce más semillas y se disemina más que el arroz cultivado), por ser una variedad de la misma especie, puede intercruzarse con el arroz cultivado, transformándose en una de las malezas más problemáticas y costosas (Gealy et al., 2002). Si bien las características de calidad química de los granos de arroz rojo, y su potencial influencia sobre la calidad del arroz cultivado, aún no están bien determinadas, el arroz contaminado con granos de arroz rojo tiene un valor comercial más bajo debido al color indeseable de los granos y la dificultad para separar ambos tipos.



Figura 3. Arroz rojo

Fuente: www.seednews.inf.br/img/94/c2.jpg

A pesar de que todos los arroces rojos encontrados en el arroz comercial han sido tradicionalmente clasificados como *Oryza sativa* sp. Indica, Vaughan et al. (2001), han demostrado claramente que tal clasificación es inadecuada desde el momento que, si bien algunos arroces rojos están íntimamente relacionados con el arroz cultivado (*Oryza sativa* sp. Indica), otros están más próximos al *Oryza sativa* sp. Japonica, y otros pertenecen a grupos distintos que incluyen ascendientes de *Oryza nirvara* y *Oryza rufipogon*. Este último, conocido como el antecesor del arroz asiático cultivado (*Oryza sativa* L.), constituye el germoplasma más importante para el mejoramiento del arroz (Song et al., 2005), habida cuenta que el gen del primer macho estéril encontrado de esta variedad de arroz salvaje, al ser introducido en un arroz cultivado, produjo el rápido desarrollo y los altos rendimientos de los arroces híbridos.



Figura 4. Arroz rojo maduro

Fuente: www.red-rice.com/as19-345-res

El análisis de los estudios realizados desde comienzos de la década de 1990 hasta nuestros días sobre competencia arroz cultivado-arroz rojo, indica que éste último produce fuertes reducciones en el rendimiento del arroz cultivado, impactando negativamente sobre el cultivar a lo largo de todo su desarrollo. Resultan particularmente ilustrativos los experimentos que durante cuatro años realizaron Pantone y Baker (1991) para evaluar la capacidad competitiva del arroz rojo (ecotipo Stuttgart strawhull, de estatura mediana) y el cultivar Mars. Determinaron que el arroz rojo fue un competidor dominante durante los cuatro años, y que una planta de esta maleza produjo una reducción del rendimiento de una de Mars equivalente a la que producirían 4 plantas del propio cultivo. La competencia

intervarietal fue considerada un indicador de la competencia de ambas especies por los mismos recursos. Pantone et al. (1992) informaron luego que la densidad del arroz rojo influía directamente sobre los componentes del rendimiento de Mars (peso de granos, porcentaje de flósculos llenos, número de flósculos por panícula y panículas por planta) e, indirectamente, sobre la fecundidad del cultivar.

Kwon et al. (1992) obtuvieron resultados similares al comparar el crecimiento y desarrollo del arroz rojo y los arroces cultivados Lemont y Newbonnet en condiciones de campo. Las diferencias en crecimiento y desarrollo fueron mayores entre el arroz rojo y los cultivados, que entre los dos cultivados. Mientras los arroces Lemont y Newbonnet produjeron similares tasas de hojas por tallo y área foliar, el arroz rojo fue más alto, produjo más tallo por m², mayor área foliar y mayor peso de materia seca, aunque presentó menor proporción de hojas por tallo al final de la estación y produjo granos con menor peso que el arroz cultivado. Kwon et al. (1992), que ya habían observado una reducción del número total de granos y el rendimiento total de ambos cultivares a causa del arroz rojo, informaron una disminución de materia seca de 100 y 130 kg/ha y de rendimiento de granos en 178 y 272 kg/ha para Newbonnet y Lemont respectivamente, por cada planta de arroz rojo. Las disminuciones en el rendimiento, aún a densidades tan bajas como 2 plantas de arroz rojo por m², fueron mayores para Lemont (cultivar de plantas semienanas, de unos 90 cm de altura), que en Newbonnet (cultivar de porte convencional, de unos 115 cm de altura). Dado que el arroz rojo produjo más panículas por m² y más materia seca al crecer junto a Lemont (cultivar bajo), que junto a Newbonnet (cultivar más alto), los autores sugirieron un efecto causado por la mayor sombra del arroz rojo sobre Lemont.

No obstante, resultados más recientes, como los informados por Estorninos et al. (2005a) no avalarían tal presunción. Estos autores estudiaron el rendimiento del arroz rojo (Stuttgart strawhull) cuando creció con tres arroces cultivados, dos altos (Kaybonnet y Guichao) y uno semienano (PI 312777). El rendimiento del arroz rojo fue menor cuando creció con el cultivar semienano, demostrando ser más competitivo con las de altura convencional. También evaluaron el crecimiento del cultivar Kaybonnet con tres ecotipos de arroz rojo (Louisiana3, Stuttgart strawhull y Katy) en experimentos a campo (Estorninos et al., 2005b). Frente a Louisiana3 (el ecotipo más alto) observaron reducciones en el Kaybonnet del 51% en la densidad de plantas, del 35% en la biomasa a 91 días después de la emergencia, y del 80% en el rendimiento. Las reducciones provocadas por Stuttgart strawhull (el ecotipo mediano) fueron, respectivamente, del 49%, 26% y 61%; mientras que Katy (el ecotipo enano) produjo disminuciones del 30%, 16% y 21%, respectivamente. Estos resultados sugerirían que el arroz rojo puede provocar importantes reducciones en el crecimiento y el rendimiento del arroz cultivado, y que los ecotipos bajos de arroz rojo pueden afectar menos que los más altos.

Además del arroz rojo, *Echinochloa crus-galli* L. Beauv (en adelante, *E. crus-galli*) es una de las malezas que más afectan el cultivo de arroz. Su éxito es atribuido a diferentes aspectos, tales como un rápido desarrollo hasta la madurez reproductiva, una alta plasticidad fenotípica, producción de importantes cantidades de pequeñas semillas, que se diseminan fácilmente, y a la latencia de la semilla (Barrett y Wilson 1981, 1983). En los arrozales, a su vez, la disminución de la profundidad del agua o el drenaje completo del campo, estimulan el establecimiento de *E. crus-galli*.

Desde el punto de vista de la competencia arroz-*Echinochloa sp*, los experimentos de Olofsdotter (2001) analizando el impacto de la densidad y de la interferencia espacial de *E. crus-galli* sobre arroz cultivados de distinto porte, indicaron que interferencias prolongadas de 1 a 20 plantas por m² de *E. crus-galli* redujeron más el rendimiento de cultivares semienanos (Lemont) que el de los de altura convencional (Newbonnet). El rendimiento de los cultivares semienanos disminuyó hasta un 21% cuando las plantas de *E. crus-galli* se encontraban a corta distancia (de 0 a 25 cm), disminuyendo su impacto negativo sobre el rendimiento de ambos cultivares al aumentar la distancia (de 25 a 100 cm). En esta misma línea de estudios se inscribe el experimento realizado por Ni et al. (2004), que analiza la competencia entre semillas húmedas de arroz y *E. crus-galli* en dos condiciones ambientales. Los resultados indicaron que los cultivares más bajos tuvieron mayores pérdidas de rendimiento y fueron competidores más débiles que los cultivares altos (por ejemplo, el híbrido IR72). Una baja densidad de *E. crus-galli* afectó más notoriamente a los cultivares de bajo macollaje. Altas densidades de la maleza provocaron mayores pérdidas de rendimiento en cultivares de alto macollaje. En todos los casos, el rendimiento se vio más comprometido en condiciones de estación húmeda, que en condiciones de estación seca, con alta luminosidad.



Figura 5. *Echinochloa crus-galli* maduro
Fuente: www.knowledgebank.irri.org

Este último aspecto concuerda con observaciones previas de Bouchade y Bayer (1993), sobre la respuesta fotosintética del arroz a cambios en la presión parcial intracelular de CO₂, intensidad de luz y temperatura de hoja, comparada con la de tres especies de *Echinochloa* (*E. crus-galli*, *E. oryzoides* y *E. phyllopogon*). Las tres especies de *Echinochloa* mostraron respuestas fotosintéticas características de las plantas C4, es decir una mayor eficiencia en la utilización de CO₂ a baja presión parcial intercelular, menores puntos de compensación y saturación de la fotosíntesis, mayores tasas fotosintéticas máximas a alta intensidad lumínica y mayor temperatura óptima de fotosíntesis, que el arroz, que es una planta C3. Bajo condiciones simuladas de verano, las cuatro especies

mostraron la siguiente habilidad fotosintética: *E. crus-galli* > *E. oryzoides* > *E. phyllopogon* > arroz.



Figura 6. Inflorescencia *Echinochloa crus-galli*
Fuente: www.missouriplants.org/Grasses

Observaciones posteriores, indicaron que las estrategias de manejo que retrasen la germinación de las especies de *Echinochloa* le pueden conferir ventajas competitivas al arroz, reduciendo la necesidad de aplicación de herbicidas. Gibson et al. (2002) trataron de determinar el período crítico de competencia entre *E. phyllopogon* y arroz. Cuando se sembró *E. phyllopogon* treinta días después que el arroz, las malezas no sobrevivieron por lo que los rendimientos del arroz no se vieron afectados. Cuando se sembró *E. phyllopogon* junto con el arroz no se observó competencia por luz, pero la importancia relativa del sombreado por parte del cultivo aumentó cuando la maleza se sembró después que el arroz.

1.6. Motivación y significado de la investigación realizada

La mayor demanda de alimentos y los buenos precios internacionales de los cereales están exigiendo se multipliquen los esfuerzos para el logro de altos rindes. En el caso del arroz, estos dependen de un eficiente control de las malezas que habitualmente se consigue con el empleo de herbicidas sintéticos. Sin embargo, esta práctica contribuye a la contaminación de cauces de riego y al desarrollo de variedades de malezas resistentes. El estudio de las propiedades alelopáticas del arroz y la identificación de los aleloquímicos involucrados constituyen líneas de investigación tendientes a la conservación de la biodiversidad y la estabilidad del ecosistema, dado que permitirían el desarrollo de cultivares más alelopáticos a través de metodologías tradicionales o biotecnología. La identificación y posterior aprovechamiento de las sustancias alelopáticas de los cultivares de arroz más frecuentemente usados en Argentina, podría reducir la necesidad del uso de herbicidas en el manejo de malezas, y fomentar una agricultura sustentable y en armonía con el ambiente.

1.7. Objetivos, hipótesis y organización de la tesis

En función del análisis de los antecedentes discutidos anteriormente, se planteó como objetivo general de esta tesis, diferenciar cultivares de arroz utilizados en la región mesopotámica en base a su potencial alelopático sobre la maleza *E. crus-galli* y analizar las diferencias químicas cualitativas y cuantitativas entre sus extractos radicales. Para ello, se organizó la tesis en capítulos, en cada uno de los cuales se plantean objetivos e hipótesis de trabajo. El primer capítulo (Fase I) tuvo como objetivo identificar, entre los cultivares de arroz más frecuentemente utilizados en la Mesopotamia argentina, los que presentan

características alelopáticas relevantes, mediante el uso de ensayos RST. La hipótesis de trabajo de la Fase I fue: Existen diferencias en la capacidad alelopática de los cultivares de arroz más utilizados en la Mesopotamia argentina. En el segundo capítulo (Fase II) se determinaron las diferencias químicas entre los extractos de raíces de cultivares con y sin actividad inhibitoria de *E. crus-galli*. La hipótesis de trabajo fue: Existen diferencias químicas cualitativas y cuantitativas entre los extractos de raíces de cultivares con y sin actividad inhibitoria sobre *E.crus-galli*.

El presente estudio constituye el primer antecedente argentino del análisis del potencial alelopático de cultivares de arroz frecuentemente usados en nuestro país y los resultados obtenidos constituyen una importante herramienta para el manejo sustentable del agroecosistema arrocero.

CAPITULO II

FASE I: IDENTIFICACIÓN DE CULTIVARES CON POTENCIAL ALELOPÁTICO

2.1. Alelopatía en arroz. Hacia el control biológico de las malezas

El estudio de los rasgos alelopáticos de los cultivos se está revelando como una promisoriosa línea de investigación por su impacto benéfico sobre la conservación de la biodiversidad y la estabilidad del ecosistema. Inderjit y Duke (2003) definieron alelopatía como la influencia directa de un compuesto químico liberado por una planta sobre el desarrollo y crecimiento de otra. Las propiedades alelopáticas son características químicas que aumentan la capacidad de los cultivares para defenderse de las malezas (Kong et al., 2006). Por lo tanto, las sustancias alelopáticas que están presentes en las variedades de las especies cultivadas se pueden capitalizar para el control de malezas, reduciendo el empleo de herbicidas y fomentando una agricultura más armoniosa con el medio ambiente. Uno de los puntos clave en el control biológico de las malezas es la búsqueda de aleloquímicos menos perjudiciales para los organismos vegetales que coexisten con las especies a controlar, que permanezcan en el ambiente sólo el tiempo necesario para cumplir su función y que luego sean fácilmente metabolizados o biodegradados. De allí que la alelopatía constituye una interesante alternativa para el control de las malezas en un escenario de agricultura sustentable.

En lo que hace específicamente al cultivo de arroz, Chou y sus colaboradores (1976, 1979) realizaron estudios identificando algunas sustancias fitotóxicas y autoinhibitorias en los extractos acuosos de rastrojos de arroz en descomposición en el suelo, observando efectos inhibitorios del crecimiento radical de *Lactuca sativa* L. y de las plántulas de arroz. Desde entonces, y hasta el momento se llevan a cabo trabajos de investigación relacionados a la obtención de cultivares comerciales con propiedades alelopáticas, se han realizado avances sobre el tema, en relación a la interferencia química intra e interespecífica de este cultivo; la identificación de algunos aleloquímicos en arroz y la identificación de QTLs relacionados con alelopatía en arroz.

2.1.1. Interferencia química intra e interespecífica del arroz

Existe una gran variedad de estudios orientados a detectar el potencial alelopático de ciertas plantas (o rastrojos) para lograr una efectiva supresión biológica de las malezas en las arroceras. Se destacan bioensayos (y experimentos a campo) realizados principalmente en Estados Unidos, Filipinas, Japón y Corea, con cultivares de uso frecuente en esos países.

Nguyen et al. (2002) analizó el potencial alelopático de *Piper methysticum* Forst. (conocido como “kava”, comúnmente usado por los nativos para propósitos farmacológicos), sobre la emergencia y el crecimiento de malezas en suelos arroceros. Los resultados de su estudio indicaron que “kava” suprime la germinación y el crecimiento de una amplia variedad de malezas de arroz, tales como *Lactuca sativa* L., *E. cruss-galli* y *Monochoria vaginalis* Presl var. *plantaginea* Solms-Laub.

Por su parte, Hong et al. (2004), estudiaron los efectos de *Clerodendrum trichotomum* L., *Datura stramonium* L., *Desmodium triflorum* L. y *Melia azedarach* L., sobre la emergencia de malezas en campos arroceros. En experimentos de invernáculo, determinaron que *D. stramonium*, *D. triflorum* y *M. azedarach* exhibieron similares capacidades inhibitorias al controlar más del 90% de las malezas. En cambio, en experimentos a campo, el material más promisorio para el control de malezas y con el que se obtuvo el máximo rendimiento de arroz fue *D. triflorum*. Los autores concluyeron que

estas plantas podrían ser usadas como herbicidas naturales (bioherbicidas) para reducir el empleo de productos sintéticos, dado que no se observaron daños en las plantas de arroz luego de su aplicación.

Paralelamente, Inderjit sugirió que la incorporación de rastrojos de arroz en el suelo podría interferir en la germinación y crecimiento de las malezas. Llevó a cabo estudios para analizar los efectos de los lixiviados de rastrojos de arroz en el crecimiento de *Brassica napus* var. *toria* L. (Inderjit y Duke, 2003) y *Phalaris minor* Retz (Inderjit, 2006). En ambos casos observó que la incorporación de rastrojos de arroz produjo una modificación química y microbiológica de las propiedades del suelo, restringiendo el crecimiento de sendas malezas.

Por su parte, Ahn y Chung (2000) evaluaron el potencial alelopático de 91 cultivares del sudeste asiático contra *E. crus-galli*. Utilizaron los extractos acuosos de cáscaras de arroz a distintas temperaturas, observando que la mayor inhibición ocurría con altas concentraciones de los extractos acuosos tibios. Concluyeron que los extractos de cáscaras de arroz podrían ser una fuente natural de herbicidas contra el capín. Ebana et al. (2001), determinaron variaciones en la actividad alelopática de extractos foliares de plántulas de arroz (var. PI312777 y Rexmont) al inhibir el crecimiento de *Heteranthera limosa* (Sw.) Willd y *Lactuca sativa* L. Olofsdotter et al. (2002) analizaron 11 cultivares de arroz en ensayos a campo para determinar su habilidad para suprimir el capín, los cuales difirieron significativamente y dichos resultados fueron razonablemente reproducibles a través de tres estaciones. Concluyeron que la habilidad alelopática en combinación con la competencia, determinan el resultado de la interferencia arroz-capín.

En esta misma línea de estudios, Chung y su equipo (2003) condujeron un bioensayo para determinar el potencial alelopático de las distintas partes de la planta de arroz sobre la germinación y el crecimiento del capín, y desarrollar métodos sencillos para seleccionar variedades alelopáticas usando caracteres genéticos y fenotípicos. Encontraron variaciones genéticas entre los cultivares de arroz en cuanto a su potencial alelopático contra la *E. crus-galli*. La mayor tasa de inhibición de esta maleza (76,9%) la obtuvieron con los extractos de rastrojos del cultivar Danganeuibangju, seguida por los extractos foliares del cultivar Dongobyeyo (74,1%) y los extractos de cáscaras del cultivar Baek (31,7%). Con respecto a la clasificación por características genéticas y fenotípicas, identificaron un mayor efecto inhibitorio en cultivares: a) domesticados (14,2%), b) de maduración media (15,1%), c) con cáscara de color (15,8%) y d) con aristas de color (16,0%). A partir de estos resultados, sugirieron que distintas partes de la planta de arroz podrían ser una fuente de herbicidas naturales y deberían tenerse en cuenta para desarrollar estándares aceptables de selección.

Seal et al. (2004b) analizaron el efecto alelopático de 28 variedades de arroz de uso frecuente en Australia sobre *Sagittaria montevidensis*. Los ensayos de laboratorio demostraron que el comportamiento de la sagitaria a los exudados radicales del arroz seguía una típica curva de dosis-respuesta. Los ensayos realizados en un medio de agar (Wu et al., 1999), revelaron la existencia de un amplio rango de potencial alelopático en los germoplasmas de arroz, donde los porcentajes de inhibición radical de sagitaria oscilaron entre el 26,6% y el 99,7%.

Kim et al. (2005) determinaron que la actividad alelopática del arroz depende de la fuente, la concentración y de la especie receptora, al evaluar la actividad inhibitoria de extractos acuosos de tallos y raíces de 3 cultivares de arroz, Taichung Native 1 (TN1), IAC165 (ambos arroces alelopáticos) y AUS196 (arroz no alelopático), que crecen en condiciones de hidroponia (Einhelling et al., 1985). De los 3 cultivares, TN1 mostró el mayor potencial inhibitorio sobre el crecimiento radical en *Echinochloa colona*, *E. crus-galli*, *E. crus-galli* var. *oryzicola*, *Triantema portulacastrum* y *Lactuca sativa* L.

Más recientemente, en el Cuarto Congreso Mundial sobre Alelopatía, realizado en Australia, en el 2005, Xuan y su equipo informaron que estudios preliminares, realizados sobre más de 100 especies alelopáticas pertenecientes a los ecosistemas de Japón y del sudeste asiático, indicaban que las propiedades alelopáticas pueden ser explotadas exitosamente para reducir malezas. En su último estudio, seleccionaron más de 30 cultivares, incluyendo arroces con alta actividad alelopática, los que fueron examinados por su impacto sobre la emergencia de malezas y enfermedades. Aplicaciones de este material vegetal a razón de 1-2 tn/ha redujo la biomasa de malezas alrededor de un 70% y aumentó la producción de arroz en un 20%. Informaron también que la incorporación de plantas alelopáticas en chacras de arroz entre 1 y 5 días luego del transplante, producía el mayor efecto en la reducción de malezas.

2.2. Bioensayos para determinar alelopatía

Como en condiciones de campo no se puede distinguir adecuadamente entre alelopatía y competencia, se recomienda utilizar bioensayos de laboratorio para evaluar el potencial alelopático de cualquier especie. En los últimos años se han desarrollado varios bioensayos, confiables, rápidos y económicos para medir y cuantificar efectos alelopáticos (Leather y Einhellig 1986, Fujii 1992, Navarez y Olofsdotter 1996, Kawaguchi et al. 1997). Leather y Eingelling (1986) fueron pioneros en la descripción de este tipo de bioensayos y enumeraron los pasos necesarios para la extracción, purificación e identificación de compuestos bioactivos. Señalaron que los bioensayos constituyen un proceso integral en todos los estudios de alelopatía y que son necesarios para evaluar el potencial alelopático de las especies.

La gran mayoría de los bioensayos diseñados para el estudio de los efectos de los aleloquímicos aislados y/o de extractos liberados por una especie (especie donadora), sobre el crecimiento y distribución poblacional de otra en su vecindad (especie receptora), incluidos los microorganismos (Inderjit y del Moral, 1997, Vandermeer, 1980, Hoagland, 2004), se basan en la tasa y la velocidad de la germinación de las semillas y/o el crecimiento de raíz y brotes de las especies receptoras en las etapas tempranas del desarrollo. Casi todos los bioensayos se han centrado en la identificación de potenciales aleloquímicos o en la evaluación de los efectos fitotóxicos de la planta donante sobre el crecimiento (o determinados procesos fisiológicos) de las plantas receptoras o malezas. El objetivo básico de estos bioensayos es determinar relaciones entre la estructura del aleloquímico y la actividad biológica del mismo y de análogos semisintéticos desarrollados a partir de estos, a efectos de aplicarlos como herbicidas o aditivos de agentes químicos reguladores del crecimiento (Fay y Duke, 1977).

En el caso del arroz, de acuerdo con Singh et al. (2006), los bioensayos utilizados para determinar alelopatía incluyen: a) selección en medio agar, en el que los productos químicos fitotóxicos, exudados por una gran masa de raíces de arroz bien desarrolladas, difunden una corta distancia para inhibir el crecimiento de las raíces de una especie receptora (Fujii, 1995); b) sistema de trampas de exudados radicales que emplean resinas y materiales en fase sólida destinados a retener los aleloquímicos de las raíces de arroz presentes en la solución acuosa (Mattice et al., 1998) y, c) Relay Seeding Technique (RST) en el que la planta a la cual se le evalúa la actividad alelopática es mantenida en un co-cultivo con otra especie que servirá de modelo para estudiar los efectos causados por la presencia de la especie donante (Navarez y Olofsdotter, 1996).

El RST es un bioensayo de planta completa, que consiste en el co-cultivo de semillas de maleza con plántulas de arroz de 7 días en cajas de Petri. Es una técnica que utiliza poco espacio y permite medir el potencial alelopático del arroz utilizando capín (*E. crus-galli*), como planta de prueba. Cuantifica la inhibición del crecimiento de las raíces de capín debido a la presencia de las plántulas de arroz. Este procedimiento ha sido utilizado rutinariamente con cientos de variedades de arroz en el IRRI (International Rice Research Institute) permitiendo la identificación de cultivares con fuerte potencial alelopático. El procedimiento también se ha utilizado para la identificación de germoplasmas alelopáticos en Corea, Australia y Camboya, con resultados satisfactorios. Los resultados muestran que existe gran variación en el potencial alelopático entre los cultivares de arroz y que alrededor del 3-4% del germoplasma probado, posee elevado potencial alelopático (Kim y Shin, 1998, Pheng et al., 1999, Kim et al., 2000).

2.3. Objetivos

El objetivo de esta primera fase del trabajo fue identificar, entre los cultivares de arroz más frecuentemente utilizados en la Mesopotamia argentina, los que presentan características alelopáticas relevantes, mediante el uso de ensayos RST.

2.4. Hipótesis

Existen diferencias en la capacidad alelopática de los cultivares de arroz más utilizados en la Mesopotamia argentina.

2.5. Materiales y métodos

El bioensayo RST se efectuó entre los meses de septiembre y diciembre de 2008. Para su ejecución se acondicionó la sala de ensayos de la Cátedra de Química de Biomoléculas (FAUBA), distribuyendo 56 cajas de Petri sobre la mesa, en un diseño completamente aleatorizado (6 cultivares por 8 repeticiones cada una, más un testigo), bajo una fuente de luz (lámpara fluorescente), conectada a un reloj temporizador. La intensidad de luz fue de 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y un fotoperíodo de 12 horas.

A continuación, se describe el protocolo que se siguió:

1. Se esterilizaron semillas de 6 de los cultivares de arroz más frecuentemente usados en Argentina, a saber: Bluebonnet 50 (PG: 82%), Cambá (PG: 86%), El Paso 144 (PG: 93%), IRGA 417 (PG: 87%), Supremo (PG: 88%) y Yerúa (PG: 85%). La esterilización se realizó sumergiéndolas durante 20 minutos en hipoclorito de sodio al 5%.

2. Se enjuagaron con abundante agua destilada, se secaron con papel tisú y se sembraron en cajas de Petri sobre papel absorbente Whatman de 3 mm, disponiéndolas en 2 columnas de 15 semillas cada una.
3. Se cubrieron con 20 g de arena de granulometría fina para frenar el arqueamiento de las raíces y se agregaron 30 ml de agua destilada a cada caja de germinación.
4. Al cuarto día se agregaron 5 ml de agua destilada por caja.
5. Al séptimo día se sembraron 15 semillas de *E. crus-galli* (PG: 95%) previamente esterilizadas (solución de hipoclorito de sodio al 5%, por 20 minutos). Se acondicionaron en una columna intermedia entre las dos hileras de semillas de arroz.
6. Se agregaron 15 ml de agua destilada.
7. Simultáneamente se sembraron 15 semillas de *E. crus-galli* solas en una nueva caja de Petri, como grupo testigo.
8. Diez días después (o sea, a los 17 días del inicio de cada bioensayo), se midió con regla milimetrada la longitud radical de las semillas de capín emergidas en cada caja, incluidas las del grupo testigo.
9. Adicionalmente se fotografiaron las cajas de Petri para contar con parámetros visuales del crecimiento radical del capín.

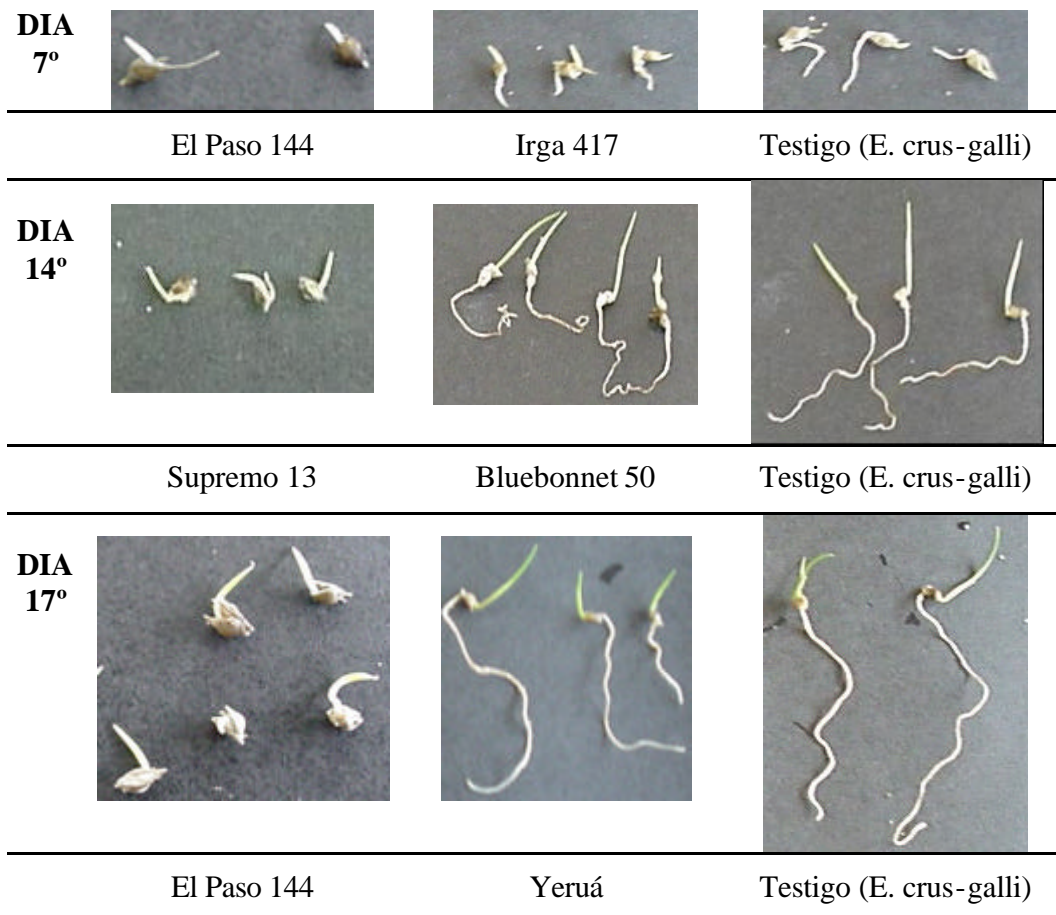


Figura 7. Crecimiento radical de los capines en presencia de un cultivar alelopático (izquierda), uno no alelopático (centro) y ninguno cultivar (derecha) durante el RST.

Las semillas de los cultivares (y las de *E. crus-galli*) fueron facilitadas por la Cooperativa de Arroceros de Villa Elisa (Entre Ríos), excepto las de Bluenonnet 50 que fueron provistas por la Arrocería San Javier (Santa Fe). Las características de los cultivares probados se presentan en el Cuadro 2, y se acompañan de una breve descripción.

Cuadro 2. Principales características de los cultivares de arroz probados

CULTIVARES PROBADOS						
	Cambá	Yerúa	Paso 144	Bluebonnet	IRGA 417	Supremo
Origen	INTA (Argentina)	UNLP (Argentina)	INIA (Uruguay)	EEUU	IRGA (Brasil)	EEUU
Tipo Planta	indica	japónica	indica	japónica	indica	indica
Macollaje	Alto	medio	alto	medio bajo	alto	alto
Ciclo (días)	125	110	125	115	110	130
Calidad grano	muy buena	buena	baja	muy buena	muy buena	buena
Amilosa	medio alta	medio baja	medio alta	medio baja	medio alta	medio alta
Rendimiento	alto	medio	alto	alto	medio alto	medio alto

Cambá (INTA-Proarroz). Este cultivar fue lanzado por INTA Concepción del Uruguay (Argentina) e inscripto en el año 2004. Es una planta semi-enana, con hoja bandera erecta, panoja de tamaño intermedio, con resistencia al desgrane pero con tendencia a presentar granos manchados por ataque de diferentes hongos según la región y las condiciones de fertilidad. Posee grano de tipo comercial largo fino, con una relación largo ancho de grano elaborado mayor de 3 (3,45) y un peso de 25,8 g por cada 1000 granos cáscara. Tiene una excelente calidad molinera y un muy bajo porcentaje de granos panza blanca y yesoso. Su estabilidad en los parámetros de calidad la ubican como la variedad preferida por el sector industrial y por el sistema de producción primaria. Su calidad culinaria está caracterizada por un buen porcentaje de amilosa y baja temperatura de gelatinización que le imprime un comportamiento de arroz suelto después de la cocción, aunque tiende a una textura muy dura al enfriarse.

Yerúa P.A. Es un cultivar desarrollado por la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata (Argentina), inscripto en el año 1976. Proviene de un cruzamiento de Fortuna por desconocido encontrada en la estación experimental de Colonia Masciá (Santa Fe). Es un cultivar de porte alto, con hojas pubescentes de láminas largas y decumbentes de color verde claro. Su cultivo puede realizarse aún en las latitudes más altas de la región arrocería argentina dada su capacidad de resistir bajas temperaturas y su corto ciclo de crecimiento. Sus granos se mantienen adheridos a la panoja firmemente y por lo tanto es resistente al desgrane aún si se demora la cosecha. Es un cultivar cuyo tipo comercial de grano es denominado largo ancho. Posee glumas carenadas y pubescentes con aristas que

aumentan de tamaño en las siembras tardías. El peso de 1000 granos cáscara es de 38 g. Su calidad culinaria es la típica de los granos japónica, con bajos porcentajes de amilosa y de temperatura de gelatinización.

El Paso 144. Este cultivar fue lanzado por la Estación Experimental del Este de la República Oriental del Uruguay en el año 1986. En Argentina fue inscripto como introducción en el año 1994. Es un cultivar semi-enano, con hojas erectas, pubescentes, de color verde claro. La panoja emerge con normalidad de la vaina, pero a madurez se encuentra por debajo del nivel de las láminas de la hoja bandera. Posee grano de tipo comercial largo fino con cáscara color pajizo, pubescente y con aristas de color y tamaño variable según las condiciones ambientales de crecimiento. Posee grano de tipo comercial largo fino con una relación largo ancho de grano elaborado mayor de 3 y un peso para 1000 granos cáscara de 26,5 g. Es sensible a la producción de granos panza blanca yesosos, lo cual impacta negativamente en la calidad de comercialización.

Bluebonnet 50, representa a los cultivares denominados genéricamente americanos, fue introducido y registrado por Palmar S.A., en 1960. Se cultiva sobre todo en la provincia de Santa Fe. Es poco macollador, con tallos altos, moderadamente resistentes al vuelco. Posee grano de tipo comercial largo fino con una relación largo ancho de grano elaborado mayor de 3,50 y un peso de 1000 granos cáscara de 24,7 g. La cáscara del grano es de color crema claro, lisa no pubescente, con aristas de color marrón claro y las puntas con pigmentación oscura debido a la presencia de antocianinas. Tiene muy buena calidad molinera y bajo porcentaje de granos panza blanca y yesoso. Por tener poca cantidad de amilosa se cocina bien, no se pega y es ideal para hacer al vapor.

IRGA 417 – Puitá INTA CL, fue lanzado por el Instituto Rio Grandense del Arroz (Brasil), en el año 1995. Su introducción e inscripción en Argentina fue realizada en 1997 por La Arrocería Argentina. Es un cultivar semi-enano, con hojas erectas pero finas y más largas que las de otros cultivares tropicales. Sus hojas y glumas son pubescentes. Emite una panoja totalmente excerta de la vaina que a la madurez permanece protegida por la lámina de la hoja bandera erecta. Es moderadamente resistente al desgrane natural, pero susceptible al vuelco por ataque de hongos. El grano normalmente no presenta aristas y corresponde a la clasificación de largo fino típico, con una relación de largo-ancho de 3,5. El peso de 1000 granos cáscara es de 24 g. La excelente transparencia de sus granos pulidos lo destacan significativamente del resto de los cultivares de su tipo. Presenta muy bajo porcentaje de granos yesosos, panza blanca, con excepción de los casos donde se registran enfermedades. Su calidad culinaria está caracterizada por un alto contenido de amilosa y una temperatura de gelatinización intermedia-baja.

Supremo13 ó QM13 fue introducido y registrado por la empresa Bayer, en 1999. Se cultiva sobre todo en la provincia de Corrientes, ocupando aproximadamente el 15% del área. Se trata de un cultivar con buena calidad de grano, buen potencial de rendimiento y está muy bien adaptado a la región. Presenta alta productividad, con plantas altas, hojas lisas y erectas. Su ciclo varía entre 130 a 135 días de emergencia a maduración. Presenta una tolerancia media a la toxicidad por hierro y moderada resistencia al hongo fitopatógeno *Pyricularia spp.*

A continuación se ofrece, también, una breve descripción de la maleza (*E. crus-galli*, o capin) empleada en el RST.

E. crus-galli, es una gramínea perteneciente a la familia de las Poáceas. Los tallos pueden superar ampliamente los 150 cm. Las hojas, desprovistas de pilosidad, presentan un limbo plano con nervio medio distintivo y carecen de lígula. La panícula y las espiguillas son grandes y pubescentes. La inflorescencia está formada por racimos insertos en un eje principal. Cada racimo integra numerosas espiguillas plano-convexas, provistas de un corto pedúnculo y densamente dispuestas a lo largo del raquis. Las espiguillas contienen dos flores, aunque la inferior, estéril, aparece reducida a las glumillas (lema y pálea inferiores). La carióspside es elipsoidea, ovoide o subesférica. Habita en suelos con alta humedad. Se propaga por semilla y tiene ciclo de vida anual.

2.6. Análisis de los datos

Los valores obtenidos de elongación radical de las plántulas de *E. crus-galli* (tanto las del grupo testigo, como las que crecieron con los distintos cultivares de arroz), fueron sometidos a distintos análisis estadístico. En primer lugar, se calcularon los índices descriptivos (medias y desviaciones típicas), los que, posteriormente, fueron sometidos a análisis de varianza con test F y las medias comparadas por el test de Tukey (5%). Para encontrar grupos de cultivares que fueran más parecidos en todos los índices medidos y en todos los experimentos, se realizó un Análisis de Agrupamiento (“Cluster Análisis”). Esta técnica multivariada se utiliza para agrupar observaciones, variables o entidades de un conjunto de datos en base a sus semejanzas o diferencias. Tiene como finalidad ubicar los objetos en grupos o “clusters” de forma sugerida por los datos, no definidos a priori, tal que los objetos en un grupo dado tiendan a ser semejantes en algún aspecto (cohesión interna del grupo) y los objetos en diferentes grupos tiendan a ser distintos (aislamiento externo del grupo). Para la ejecución de la totalidad de los análisis estadísticos se utilizó el programa InfoStat/P (Di Rienzo, 2010).

2.7. Resultados

A los 17 días del inicio del bioensayo, se midió la longitud radical de las plántulas de *E. crus-galli*, tanto de las crecidas con los diferentes cultivares de arroz, como las del grupo testigo (Figuras 8 y 9).



Figura 8. Plántulas de *E. crus-galli* que crecieron con El Paso 144 (izquierda) y capines que crecieron solos (derecha)



Figura 9. Plántulas de capín que crecieron con Bluebonnet 50 (izquierda) y capines que crecieron solos (derecha)

En el Cuadro 3 se presentan los índices descriptivos (medias y desvíos típicos) correspondientes al crecimiento radical de los capines, tanto en el grupo testigo (sólo capines) como en los grupos experimentales (junto a los 6 cultivares de arroz probados)

Cuadro 3. Número de raíces (n), medias (ordenadas en sentido descendente) y desvíos típicos correspondientes a la longitud radical de los capines en el grupo testigo y en los grupos experimentales.

Cultivares	n = 740	Media	Desvío típico
Testigo	116	6,24	0,77
Supremo 13	101	6,07	0,58
Cambá	105	5,84	0,58
Yeruá	100	5,93	0,56
Irga 417	102	5,75	0,71
El Paso 144	112	1,34	1,07
Bluebonnet 50	97	1,09	0,49

Como se puede observar en el cuadro precedente, el mayor número de raíces (n=116), así como la mayor longitud radical (6,24 cm) de los capines, se registró cuando éstos crecieron solos (grupo testigo). Cuando crecieron con los cultivares Supremo 13 (n=101; 6,07 cm), Cambá (n=105; 5,84 cm), Yeruá (n=100; 5,93 cm) e Irga 417 (n=102; 5,75 cm), mostraron pequeñas disminuciones tanto en el número de raíces como en la longitud radical, siendo el cultivar Supremo 13 el que menos efecto surtió sobre los capines. En cambio, cuando crecieron junto a los cultivares El Paso 144 (n=112; 1,34 cm) y Bluebonnet 50 (n=97; 1,09 cm), se registró una fuerte caída en la elongación radical de los capines, si bien no se observó una disminución tan marcada en cuanto al número de raíces. Con respecto a este último aspecto, si bien puede llamar la atención la cantidad de raíces que se registraron cuando los capines crecieron junto al Paso 144 (n= 112), es conveniente considerar este aspecto a la luz de la desviación típica registrada (s= 1,07), lo que está indicando una importante heterogeneidad, que en este caso específico, se tradujo en raíces de longitud muy variable. Los capines que crecieron con el cultivar Bluebonnet 50 mostraron el menor número de raíces y la menor elongación de las mismas. La Figura 10 muestra las diferencias observadas en la elongación radical de la maleza.

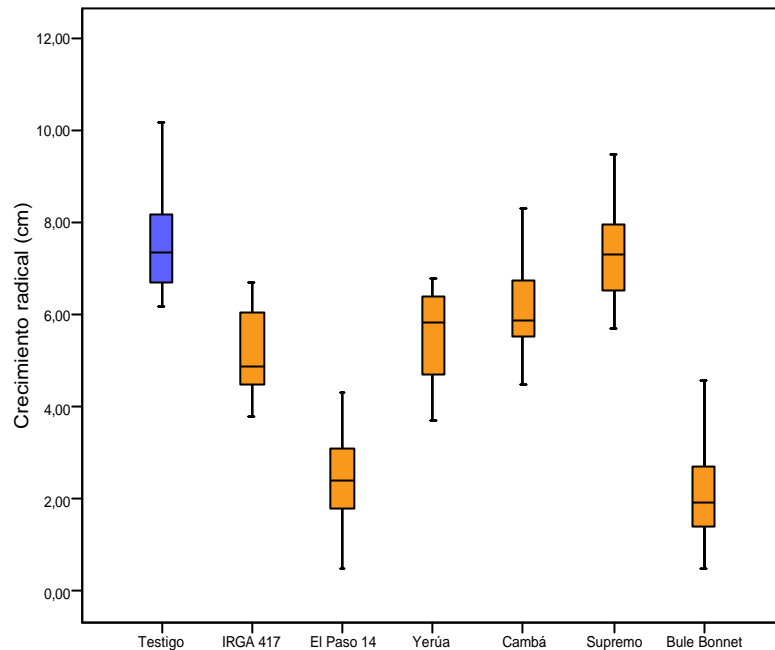


Figura 10. Diagrama de caja de la longitud radical (cm) de los capines del grupo testigo (caja azul) y de los que crecieron en los distintos grupos experimentales (cajas naranjas). Esta gráfica encierra el rango intercuartil de los datos en una caja que tiene la mediana representada mediante la rayita horizontal. El límite superior de cada caja corresponde al cuartil 3 (Q_3) o percentil 75 (P_{75}). El límite inferior corresponde al cuartil 1 (Q_1) o percentil 25 (P_{25}). Además de la caja, se prolongan extensiones, que muestran las observaciones extremas en la muestra

La caja azul representa el crecimiento radical de plántulas de capín que crecieron solas (grupo testigo), en tanto que las cajas anaranjadas representan el de las que crecieron en los grupos experimentales. La Figura 10 muestra que, en comparación con el grupo testigo, los capines que crecieron junto a las variedades El Paso 144 y Bluebonnet 50 presentan las menores longitudes radicales. Esta marcada inhibición radical podría atribuirse *a priori* al mayor potencial alelopático de estos dos cultivares de arroz. No obstante, y para determinar si las diferencias radicales observadas eran estadísticamente significativas, se realizó el cálculo de análisis de la varianza simple (ANOVA, Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de la varianza de la longitud radical de los capines en función de las diferentes condiciones experimentales.

Fuente	Suma de los cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F	p
Modelo	3444,917(a)	6	574,153	1118,680	0,000
Variedad	3444,917	6	574,153	1118,680	0,000
Error	376,206	733	0,513		
Total	19561,510	740			

$$R^2 = 0,902; R^2 \text{ ajustada} = 0,901$$

El significativo valor de la prueba F calculada ($F_{(733,6)} = 1118,680$; $p < 0,000$) indica que las diferencias observadas en la longitud radical de las plántulas de capín es producto de los tratamientos experimentales (cultivares probados) implementados en el bioensayo RST. A su vez, el significativo valor de R^2 (ajustada = 0,901) corrobora tales apreciaciones, desde el momento que está indicando que el 90% de las variaciones en la elongación radical de la maleza se deben al efecto de los cultivares (tratamientos) con los que se han desarrollado. Seguidamente, y con el propósito de identificar los cultivares con mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento y desarrollo de las plántulas de capín, se procedió al cálculo de las correspondientes comparaciones múltiples, a través de las pruebas de Tukey (Cuadro 5).

Cuadro 5. Pruebas de comparación de medias de Tukey comparando la longitud radical de cada tratamiento

Cultivar	Medias	n			
Testigo	6,24	124	A		
Supremo 13	6,07	101	A	B	
Yerúa	5,93	100		B	C
Cambá	5,84	100		B	C
IRGA 417	5,75	102			C
El Paso 144	1,34	116			D
Bluebonnet 50	1,09	97			D

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Como se puede observar, las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey no sólo corroboraron las diferencias numéricas registradas en el Cuadro 3, sino que permitieron visualizar diferentes nucleamientos (Figura 12) de los grupos experimentales en función del nivel de inhibición del crecimiento radical de las plántulas de capín.

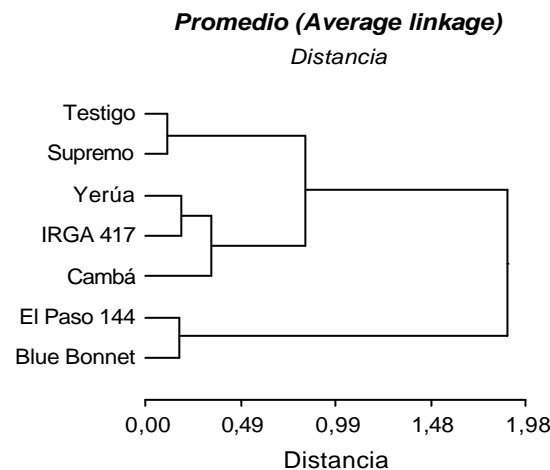


Figura 11. Dendrograma que muestra los cuatro grupos jerárquicos de los distintos tratamientos (cultivares) utilizando como criterio de agrupamiento la distancia euclídeana

En la Figura 11 se muestra el dendograma obtenido a partir del análisis de conglomerados realizado, que representa el agrupamiento jerárquico de los tratamientos tomando en cuenta las similitudes entre ellos. El eje x representa la similitud entre los tratamientos, mientras que el eje y representa los tratamientos en estudio. Se considera que, a un nivel de agrupamiento más bajo, mostrado en el eje x , los tratamientos que se combinan son más similares entre sí, y viceversa.

El análisis del dendograma precedente muestra cuatro agrupamientos iniciales que luego se reagrupan en dos núcleos o “clusters” bien diferenciados. Se puede observar que, inicialmente, el grupo testigo (capines que crecieron solos) se agrupa con la variedad Supremo 13 en lo que se podría denominar “grupo 1”. Este agrupamiento estaría indicando que los capines que crecieron con la variedad Supremo 13 se desarrollaron de manera muy similar a los que crecieron solos (grupo testigo), lo que permitiría anticipar que este cultivar no es inhibitorio para *E. crus-galli*. Los cultivares Yeruá e IRGA 417 conforman un segundo núcleo (“grupo 2”), al que luego se le asocia el cultivar Cambá (“grupo 3”), se presentan como “débil” o “ligeramente” alelopáticos, ya que si bien logran inhibir el crecimiento radical de los capines, esta inhibición no llega a ser lo suficientemente decisiva como para diferenciarlos del grupo 1 (no alelopático) y terminan conformando con este grupo 1 el primer gran reagrupamiento o “cluster” de segundo orden que se observa en la zona superior del dendograma. Finalmente, el “grupo 4” aparece representado por las variedades El Paso 144 y Bluebonnet 50, que conforman el segundo gran reagrupamiento. En contraposición con el primero, este segundo “cluster” queda conformado por los cultivares de arroz con mayor potencial alelopático contra *E. crus-galli*. Se distinguen entonces dos grupos diferenciados, en los que cualquier variable perteneciente a uno de ellos, presenta un nivel de disimilitud alto con respecto a cualquier otra variable que pertenezca al otro grupo.

2.8. Discusión de los resultados obtenidos en el RST

El objetivo de esta primera fase del estudio fue identificar el potencial alelopático de algunos de los cultivares de arroz más frecuentemente empleados en la Mesopotamia argentina. Con tal propósito se probó el impacto de seis cultivares (Cambá, El Paso 144, Bluebonnet 50, IRGA 417, Supremo 13, Yeruá) sobre el desarrollo de una de las principales malezas del arroz (*E. crus-galli* o capín), a través de un bioensayo RST.

Los resultados obtenidos muestran que, al menos dos de los seis cultivares probados poseen características alelopáticas importantes, desde el momento que inhibieron el desarrollo radicular de los capines que crecieron junto a ellos. Se trata de los cultivares El Paso 144 y Bluebonnet 50, los que mostraron fuerte actividad alelopática sobre el capín. Datos similares a los informados recientemente por Seal y Pratley (2010), quienes encontraron que varios de los cultivares de arroz que estudiaron (Amaroo, Jarrah, Millin y Illabong) inhibieron el crecimiento radical de las malezas en algo más del 90%.

En cuanto al origen de los cultivares, los resultados indican que El Paso 144 (de tipo indica) mostró menor actividad alelopática que Bluebonnet 50 (de tipo japónica tropical), este último fue el que dejó emerger la menor cantidad de raíces de *E. crus-galli*, resultando más cortas y homogéneas. Tales resultados coinciden con las observaciones de Khanh et al. (2007), donde determina que si bien los cultivares de tipo indica muestran cierta actividad

inhibitoria frente a diversas malezas del arroz, no son los que presentan el mayor potencial alelopático. También concuerdan con lo informado por Fujii y Shibuya (1992), quienes señalaron que los cultivares tipo japónica tropical (y el arroz africano o *Oryza glaberrima*) poseen un mayor potencial alelopático que otros tipos japonico o tipo indica. Resultados semejantes obtuvieron Lee et al. (2004), quienes evaluaron la actividad alelopática sobre capín de 749 cultivares de arroz, clasificados en seis grupos (indica, japónica, híbridos, mejorados, nativos y arroz maleza), estableciendo que los cultivares japónica tienen mayor capacidad de supresión de malezas que los indica y los híbridos. Hay que destacar, además, que el mayor potencial alelopático exhibido por el Bluebonnet 50, está en línea con las observaciones de Lee et al. (2004) quienes informaron que los cultivares de arroz de maduración tardía con pocas panojas (como es el caso del Bluebonnet 50) son más alelopáticos que los cultivares de maduración temprana con mayor número de panojas, como es el caso del Paso 144.

CAPITULO III

FASE II: IDENTIFICACIÓN DE ALELOQUÍMICOS

3.1. Aleloquímicos. Algunas técnicas para su análisis

Aunque la mayoría de los tejidos vegetales contienen potenciales aleloquímicos (Khan et al., 2007), sólo los compuestos liberados por la planta al medio ambiente pueden ejercer un efecto alelopático sobre otro organismo. Numerosos especialistas coinciden en señalar que, para los estudios alelopáticos de especies que se caracterizan por acumular aleloquímicos en las raíces, son biológicamente más significativas las determinaciones en los tejidos radicales (Lee et al., 2008; Seal y Pratley, 2010), que las de otros tejidos de la planta. Sin embargo, tales determinaciones son más difíciles de realizar ya que los compuestos responsables se encuentran en cantidades muy pequeñas y dentro de matrices complejas (Rimando et al., 2001). De allí que, hasta el momento, se registren relativamente menos estudios enfocados en el análisis de los tejidos radicales.

En rasgos generales el análisis químico de una muestra de material vegetal transcurre a través de distintas etapas, las cuales involucran en un principio los cuidados correspondientes a la elección adecuada de los especímenes a estudiar, su acondicionamiento y preservación, para llegar finalmente a los procesos de separación y caracterización de las estructuras químicas de los aleloquímicos. La separación de productos naturales requiere, en general, la utilización de algún tipo de técnica cromatográfica, aunque no siempre es necesario el aislamiento de los compuestos puros para su identificación. Ciertos derivados de hidrocarburos, terpenos y compuestos fenólicos pueden identificarse utilizando técnicas cromatográficas de alta resolución, seguidas de la comparación con sustancias conocidas (en algunos casos patrones comerciales, y en otros sustancias previamente descritas en la literatura), sin la necesidad de purificar y/o aislar el componente individual. A través de estas técnicas cromatográficas es posible determinar además su concentración. Su evolución en cuanto a mayor selectividad y sensibilidad ha permitido el análisis de pequeñas cantidades de mezclas complejas de compuestos (Durant et al., 2002) destacándose la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y la cromatografía de gas-líquido o cromatografía gaseosa (CG). Esta última posibilita el estudio de compuestos no polares y volátiles o de metabolitos secundarios polares derivatizados, para aumentar su volatilidad. Cuando el cromatógrafo gaseoso se acopla a un espectrómetro de masa, el bombardeo de electrones sobre estos metabolitos produce rupturas características de sus estructuras químicas, dando lugar a diferentes fragmentos iónicos los cuales son informados a través una representación gráfica, el espectro de masa. Por ende, este último brinda información detallada de las características estructurales e identidad de una sustancia, comportándose como una verdadera huella digital.

En un espectro de masa (EM) se observan líneas verticales como señales correspondientes a los fragmentos iónicos positivos en los que puede fragmentarse una sustancia en condiciones predeterminadas. La altura de cada línea indica la abundancia relativa de ese pico (fragmento iónico). Tanto la relación masa/carga (m/z) de cada fragmento como la abundancia relativa de los mismos determinan el espectro de masa, donde puede observarse en ocasiones el ión M^+ correspondiente al peso molecular.

La cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa es actualmente la más empleada en el análisis de metabolitos secundarios polares. Las diferentes afinidades de estos compuestos por las fases estacionarias modificadas (C_8 , C_{18} , C_{30}) y por las fases móviles (mezclas binarias o ternarias de solventes como agua, metanol, acetonitrilo)

permiten la resolución de las muestras. En los últimos años se lograron interfaces que permitieron acoplar el cromatógrafo líquido de alta resolución al espectrómetro de masa (CLAR-EM) dando lugar a una de las herramientas de mayor importancia en el estudio de los productos naturales (Haig, 2001; Ferrer Roser, 2004). Se obtienen espectros de masa con menor número de fragmentaciones, dado que la energía utilizada para la ionización del compuesto es menor, y frecuentemente el ión molecular M^+ está presente.

Para la caracterización de las estructuras químicas se utilizan también otros métodos espectroscópicos como la Espectroscopía infrarroja (IR), ultravioleta (UV), y la de resonancia magnética nuclear (RMN- ^1H y RMN- ^{13}C , mono y bidimensional). La estructura de sustancias cristalinas puede ser determinada por cristalografía de rayos X (Canals, 2008).

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear es ampliamente utilizada en la elucidación estructural de moléculas complejas. Las técnicas monodimensionales RMN- ^1H y RMN- ^{13}C proveen información de los desplazamientos químicos de los diferentes tipos de protones y átomos de carbono presentes en la molécula. Las técnicas bidimensionales homonucleares (COSY, TOCSY, NOESY) y heteronucleares (HMBC, HMQC) contribuyen a la caracterización inequívoca de estructuras novedosas (Canals, 2008).

3.2. Aleloquímicos en arroz

La búsqueda de aleloquímicos en arroz ha generado estudios de los diferentes órganos de la planta. Los primeros trabajos se efectuaron sobre los rastrojos frescos y en descomposición, luego sobre tallos y hojas, para, finalmente concentrarse en la raíz y sus exudados y cáscaras del grano.

Los aleloquímicos en rastrojos de arroz (fresco o en descomposición) se comenzaron a estudiar en la década del 70. Kuwatsuka y Shindo (1973) identificaron diversos ácidos fenólicos y esteroides en rastrojos frescos de la variedad japónica Sachikaze, mientras que Chou y Lin (1976) sólo aislaron ácidos fenólicos libres en los primeros estadios de descomposición de rastrojos de variedades indicas. Una de las contribuciones más recientes en este contexto ha sido la realizada por Kong et al. (2006), quienes analizaron rastrojos de dos variedades de arroces alelopáticos (PI312777 y Huagan-1) y una variedad no alelopática (Huajingxian). Observaron que los cultivares alelopáticos liberaban 3-isopropil-5-acetoxiciclohex-2-en-1-ona y 5,7,4-trihidroxi-3,5-dimetoxiflavona (tricina) (Figura 12) a niveles tóxicos. Estas sustancias no fueron detectadas en el arroz no alelopático. Los rastrojos de las tres variedades liberaron compuestos fenólicos relacionados a la descomposición de ligninas, capaces de inhibir a los plantíos sucesivos.

Cuadro 6. Aleloquímicos identificados en rastrojos de arroz, frescos y en descomposición

Clasificación química	Componente identificado	Referencia seleccionada
Ácidos Fenólicos	Ácido benzoico	Kuwatsuka y Shindo (1973)
	Ácido cafeico	Kuwatsuka y Shindo (1973)
	Ácido <i>p</i> -cumárico	Chou y Lin (1976)
	Ácido gentísico	Kuwatsuka y Shindo (1973)
	Ácido protocatéquico	Kuwatsuka y Shindo (1973)
	Ácido salicílico	Kuwatsuka y Shindo (1973) Chou y Lin (1976)
	Ácido sinápico	Kuwatsuka y Shindo (1973)
	Ácido siríngico	Kuwatsuka y Shindo (1973) Chou y Lin (1976)
	Ácido ferúlico	Chou y Lin (1976)
	Ácido mandélico	Chou y Lin (1976)
	Ácido vanílico	Chou y Lin (1976)
	Esteroides	Ácido β -resorcílico
Otros Constituyentes	3-isopropil-5-acetoxiciclohex-2-en-1-ona 5,7,4-trihidroxi- 3,5-dimetoxiflavona	Kong et al. (2006)

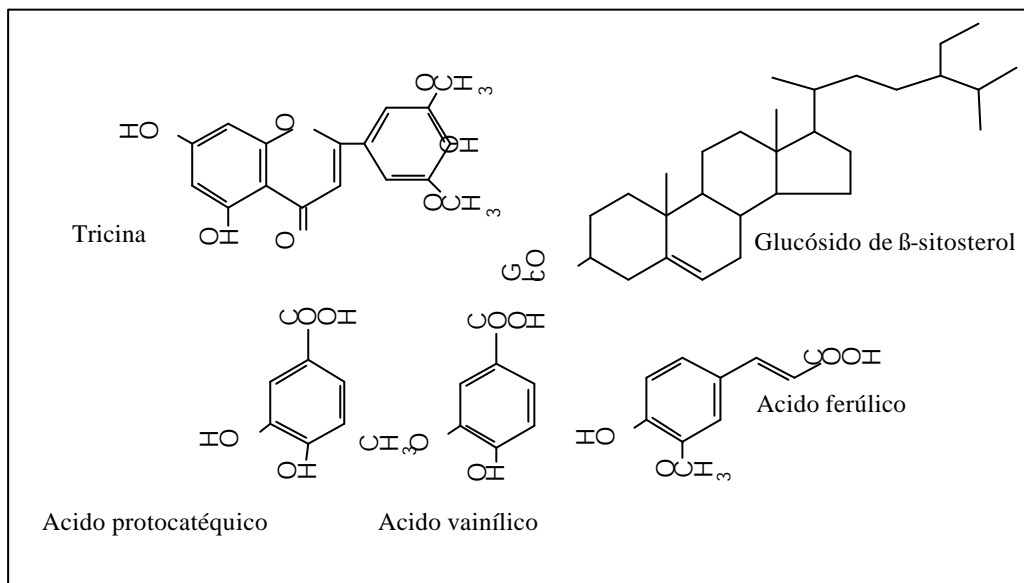


Figura 12. Estructuras de algunos aleloquímicos identificados en rastrojos de arroz frescos y ya en proceso de descomposición.

Durante ese período también se realizaron ensayos tendientes a identificar los aleloquímicos en tallos y hojas de arroz. El primer estudio en esta dirección fue realizado por Kato y colaboradores (1973) quienes identificaron derivados diterpénicos. En tanto que Chou y colaboradores en distintas oportunidades (1979; 1991) determinaron la presencia de

ácidos fenólicos libres y derivados fenólicos en estas partes de la planta de arroz. Más recientemente, Kato-Noguchi e Ino (2003) realizaron un ensayo en hidroponía con 5000 semillas del cultivar japonés Koshihikari por un lapso de 14 días, luego de los cuales analizaron la solución. Aislaron un derivado diterpénico (momilactona B), que consideraron uno de los principales causantes del efecto inhibitorio de las plántulas de este cultivar, y realizaron la elucidación estructural del compuesto mediante el uso de técnicas de espectrometría de masa y espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

Cuadro 7. Aleloquímicos identificados en hojas y tallos de arroz

Clasificación química	Componente identificado	Referencia seleccionada
Derivados Diterpénicos	Momilactonas A y B	Kato et al. (1973) Kato Noguchi e Ino (2003; 2005)
Ácidos Fenólicos	Ácido ferúlico	Chou et al. (1991)
	Ácido <i>m</i> -cumárico	Chou et al. (1991)
	Ácido <i>o</i> -cumárico	Chou et al. (1991)
	Ácido <i>p</i> -cumárico	Chou y Chiou (1979)
	Ácido gálico	Chou et al. (1991)
	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	Chou et al. (1991)
	Ácido protocatéquico	Chou et al. (1991)

El mismo grupo de investigación (Kato-Noguchi e Ino, 2005) aisló y purificó momilactona B, determinó su estructura química y observó que inhibía el crecimiento de tallos y raíces de malezas en concentraciones mayores a 3 nmol mL⁻¹ aumentando la inhibición proporcionalmente a su concentración. Su concentración en tallos y raíces aumenta con el crecimiento de la planta hasta inicios de la floración y luego comienza a disminuir, por lo que determinaron que, en promedio, una planta de arroz libera al ambiente cerca de 100 µg de momilactona B durante todo su ciclo de vida. Su capacidad de inhibir el crecimiento de las malezas y la presencia de ésta en las plantas de arroz, sugiere que puede tener un destacado rol alelopático. Simultáneamente, Kong et al. (2006), probaron que los aleloquímicos involucrados en la actividad alelopática del arroz son diferentes, según se trate de plantas vivas o muertas. En sus ensayos, encontraron además que las concentraciones de aleloquímicos liberados por las plántulas de arroz al suelo, aumentaron drásticamente cuando estaban rodeados de *E. crus-galli*. Concluyeron que las plantas vivas de ciertas variedades alelopáticas parecen ser capaces de detectar la presencia de vecinos de otras especies y responder aumentando la producción de aleloquímicos.

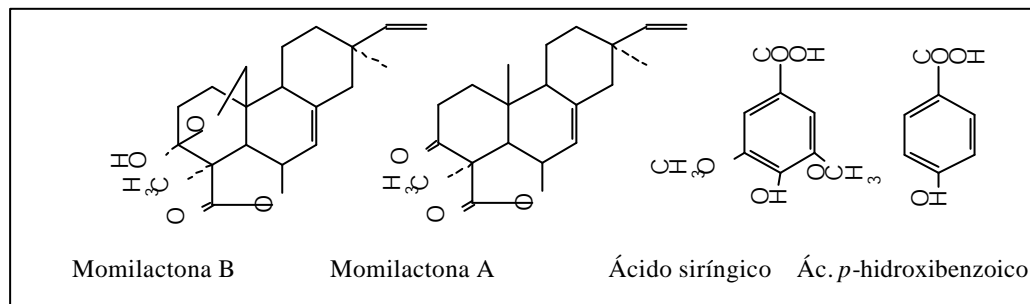


Figura 13. Compuestos diterpénicos y fenólicos aislados de hojas y tallos de arroz

Uno de los primeros estudios sobre los aleloquímicos en exudados radicales de arroz fue realizado por Soejima et al. (1992), quienes verificaron la presencia de citoquininas libres y zeatina. Durante los años 2000 se multiplicaron estos estudios, destacándose los realizados por Rimando et al. (2001), Kato-Noguchi e Ino (2003), Kong et al. (2004), Seal y Pratley (2010) quienes determinaron ácidos fenólicos, momilactonas A y B además de derivados indólicos, presentes en los exudados radicales de variedades de arroz con características alelopáticas.

Rimando y sus colaboradores (2001) extrajeron raíces de Taichung Native 1, cultivar alelopático que creció en hidroponia y fraccionaron el extracto. Los compuestos identificados fueron ácido azélico, ácido *p*-cumárico, 1*H*-indol-3-carboxaldehído, ácido 1*H*-indol-3-carboxílico, ácido 1*H*-indol-5-carboxílico y el bis(2-etilhexil) éster del ácido 1,2-benzendicarboxílico. Observaron también que a concentraciones mayores a 3 mM, el ácido *p*-cumárico muestra actividad alelopática contra *E. crus-galli*.

He et al. (2005) prepararon exudados radicales de dos cultivares de arroz (un alelopático, el PI312777 y otro no alelopático, Lemont), e identificaron los compuestos presentes. Detectaron 36 compuestos en PI312777 y 93 en Lemont, correspondiendo los mismos a terpenoides, derivados fenólicos, quinonas, aldehídos o cetonas, compuestos heterocíclicos, alcoholes y ésteres, observando diferencias cuali-cuantitativas entre los dos cultivares de arroz. El potencial alelopático es producto de la interacción entre los compuestos, resultando en efectos sinérgicos o antagónicos entre ellos. Trabajos de Chung et al. (2006) y Seal (2004a y 2004b) confirmaron la presencia de ácido abiético, ácido 4-fenilbutírico y etilenbenzaldehído.

Cuadro 8. Aleloquímicos identificados en la raíz de arroz y en sus exudados

Clasificación química	Componente identificado	Referencia
Citoquininas	Citoquininas	Soejima et al. (1992)
Indoles	Ácido azelaico	Rimando et al. (2001)
	1 <i>H</i> -indol-3-carboxaldehído	Rimando et al. (2001)
	Ácido 1 <i>H</i> -indol-3-carboxílico	
	Ácido 1 <i>H</i> -indol-5-carboxílico	
Derivados diterpénicos	Momilactona A y B	Kato-Noguchi e Ino (2003, 2005)
		Chung et al. (2006)
Ácidos fenólicos	Ácido cafeico	Kong et al. (2006)
	Ácido <i>p</i> -cumárico	Seal et al. (2004a)
		Seal et al. (2004a)
	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	Inderjit et al. (2002)
		Seal et al. (2004a)
		Inderjit et al. (2002)
	Ácido salicílico	Seal et al. (2004a)
	Ácido vanílico	Seal et al. (2004a)
Esteroides	Ácido siríngico	Seal et al. (2004a)
	2-(1,1-dimetiletil)-4-metil- fenol,	He et al. (2005)
	2,4-bis(1,1-dimetiletil)- fenol,	He et al. (2005)
	Peroxido de ergosterol y 7-ceto-estigmasterol	Macias et al. (2006)
		Song et al. (2004)

Otros constituyentes	bis (2-etilhexil) éster del ácido 1,2-bencendicarboxílico	Rimando et al. (2001)
	2-Methyl-1,4-bencenodiol	Kim y Kim (2000)
	3-Isopropil-5-acetoxiciclohexen-2-ona	Kong et al. (2004)
	4- etilenbenzaldehido	Mattice et al (1998)
	Acido 2- y 4-Hidroxifenilacético	Seal et al. (2004b)
	Acido 5-Hidroxiindol-3-acético	Seal et al. (2004b)
	Acido 4-fenilbutírico	Seal et al. (2004b)
	Ácido Abiético	Seal et al. (2004a)
	Lanast-7,9(11)-dien-3a,15a-diol-3a-glucofuranósido	Chung et al. (2006)
	Resorcinoles	Bouillant et al. (1994)

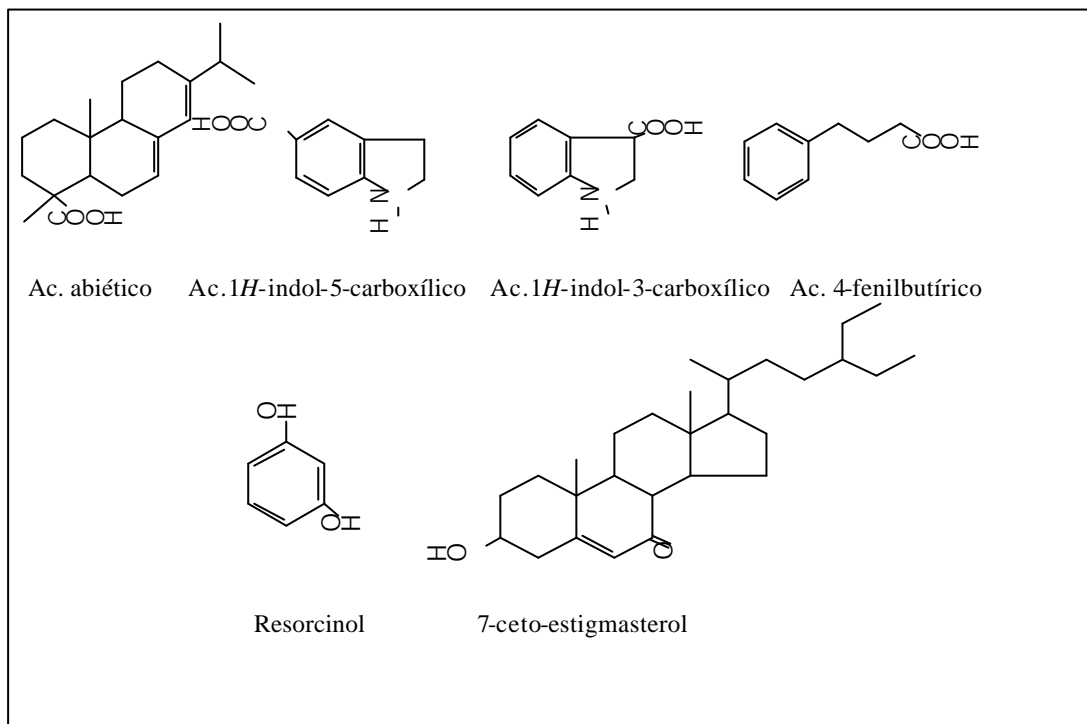


Figura 14. Compuestos diterpénicos y derivados indólicos identificados en exudados de raíz y raíces de arroz.

Las fitoalexinas son aleloquímicos de bajo peso molecular que se acumulan en las plantas luego de su exposición a los microorganismos. En arroz se han aislado e identificado 14 diterpenoides. Los fitocasonos A-E, las oryzalexinas A-F, las oryzalexinas S y las momilactonas A y B son biosintetizados a partir de la ruta del geranyl-geranyl-difosfato (GGDP) vía *ent*-cassa-12,15 dieno, *ent*-sandaracopimaradiene, stemar-13-en y β -pimara-7,15-dieno (Figura 15). La conversión del GGDP en los hidrocarburos cíclicos está catalizada por diferentes ciclasas. Toyomasu et al. (2008) identificaron seis genes que codifican las ciclasas responsables de la biosíntesis de las fitoalexinas tanto en arroces japónica como índica (Prisic et al., 2004; Wilderman et al., 2004). La Figura 15 muestra la

forma en la que las dos ciclasas (*ent*- y *syn*-) dan lugar a los cuatro tipos de fitoalexinas diterpénicas presentes en arroz.

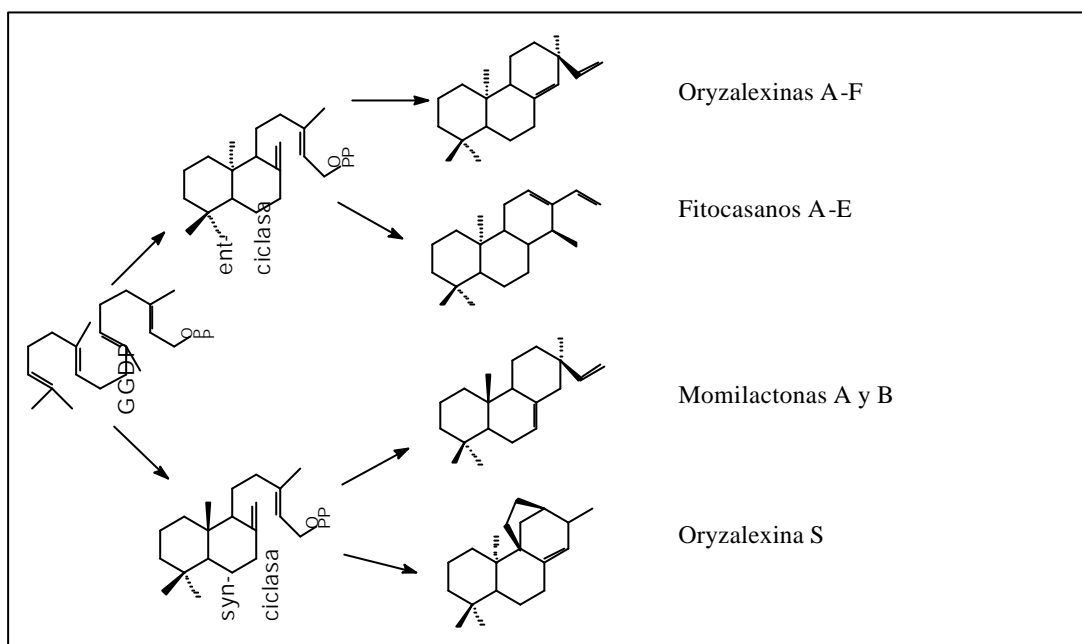


Figura 15. Biosíntesis de las fitoalexinas de Arroz (adaptado de Toyomasu et al., 2008)

En la Figura 16 se presenta la estructura de los fitocasanos A-E identificados en las raíces de arroces tanto índica como japónica (Otomo et al., 2004).

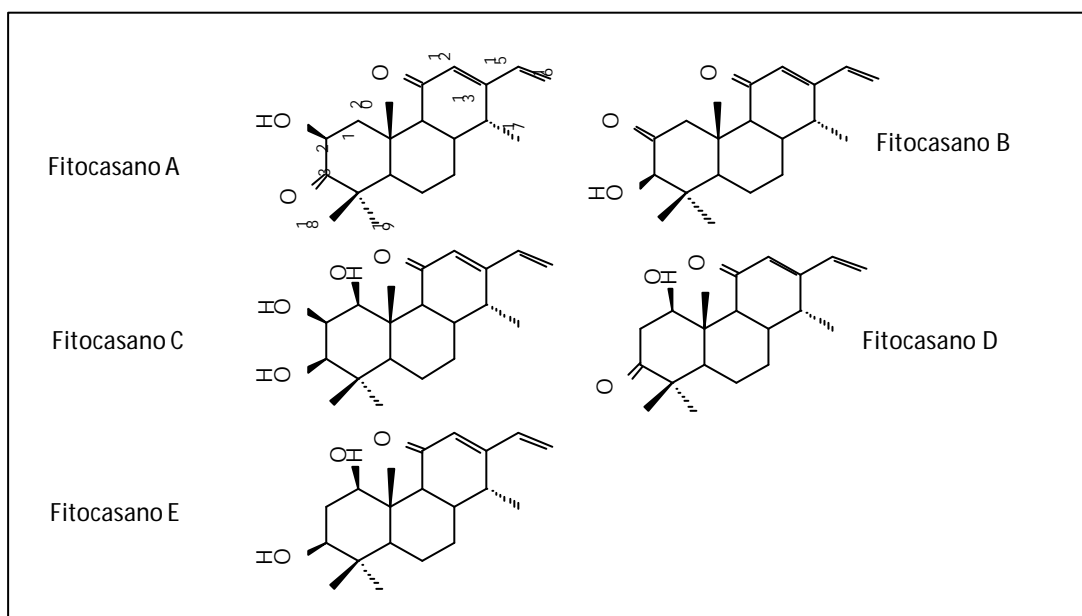


Figura 16. Estructuras químicas de los Fitocasanos A-E

Chung y su equipo (2005 y 2006) estudiaron la cáscara del arroz como probable liberadora de compuestos alelopáticos, e informaron la presencia de derivados di y triterpenoidales junto a otros derivados fenólicos. Simultáneamente, Kim y colaboradores (2007) identificaron momilactona B en las cáscaras de arroz como uno de los compuestos activos evaluando su actividad citotóxica. Recientemente, Butsat y colaboradores (2009), detectaron ácidos fenólicos en la cáscara del grano de arroz durante todo el ciclo de vida, los niveles fueron incrementando desde emergencia hasta floración y luego disminuyeron hasta alcanzar su nivel más bajo en madurez.

Cuadro 9. Aleloquímicos identificados en la cáscara del grano de arroz.

Clasificación química	Componente identificado	Referencia
Derivados diterpénicos	Momilactonas A y B	Chung et al. (2005) Kim et al. (2007)
Esteroides	Estigmastanoles (3 β - <i>p</i> -gliceroxidihidrocoumarato y -3 β - <i>p</i> -butanoxidihidrocoumarato)	Chung et al. (2006)
Acidos fenólicos	Ácido ferúlico Ácido <i>p</i> -cumárico Ácido gálico	Butsat et al. (2009)
Otros constituyentes	Lanost-7,9(11)-dien3a,15a-diol-3a- <i>D</i> -glucofuranosido	Chung et al. (2006)

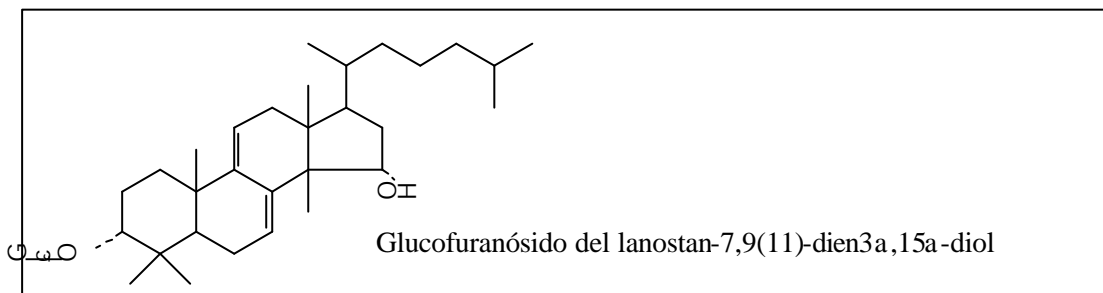


Figura 17. Derivado triterpenoidal identificado en cáscaras de arroz

Jung et al. (2006) cuantificaron momilactona A y B en la cáscara de 99 cultivares de arroz. Entre ellos, se identificó momilactona A en 66 cultivares y momilactona B en 58 cultivares. La mínima proporción en la que estos compuestos están presentes en todos ellos hacen que el manejo de las enormes cantidades de cáscara de arroz necesarias para el control de malezas resulte poco viable (Kim y Shim, 1998). Kato-Noguchi e Ino (2005), informaron que el efecto inhibitor de momilactona B fue mucho mayor que la de momilactona A. Jung et al. (2006) indicaron que la diferencia en el efecto inhibitor podía explicarse en términos de las diferentes interacciones entre compuestos y/o de la diferente sensibilidad de las plantas receptoras cuando crecen en condiciones de laboratorio respecto de las que crecen a campo. Sin embargo, se necesitan más estudios para conocer el mecanismo de acción de las momilactonas A y B en la alelopatía del arroz.

3.3. Objetivo

El objetivo de esta segunda fase del trabajo se orientó a determinar las diferencias químicas entre los extractos de raíces de cultivares con y sin actividad inhibitoria de *E. crus-galli*. Tales análisis se efectuaron a través de técnicas cromatográficas y espectroscópicas a efectos de identificar los aleloquímicos presentes.

3.4. Hipótesis

Existen diferencias químicas cualitativas y cuantitativas entre los extractos de raíces de cultivares con y sin actividad inhibitoria sobre *E.crus-galli*.

3.5. Instrumental, materiales y metodologías utilizadas

3.5.1. Obtención de material vegetal

Los cultivares que demostraron mayor capacidad alelopática durante la Fase 1, Bluebonnet 50 y El Paso 144, y el carente de ella, Supremo 13, se cultivaron según la técnica descrita por Rimando et al. (2001), a la que se le incorporó algunas modificaciones. El procedimiento para la ejecución de esta técnica es el siguiente:

1. Las semillas arroz que han de utilizarse se lavan y esterilizan con solución de NaOCl (5%) por espacio de 30 minutos
2. Se enjuagan dos veces con agua destilada y se ponen a germinar en cajas de Petri a razón de 20 semillas por caja.
3. Una vez germinadas, las plántulas se pasan a solución hidropónica donde permanecen por 40 días, hasta el momento de cosecha.

Se efectuaron dos ensayos de puesta a punto de esta técnica, siguiendo cada uno de los pasos indicados. Sin embargo, en ambas oportunidades, se observó desarrollo algal a los pocos días de pasar las plántulas a la solución hidropónica. Para superar este inconveniente, se decidió emplear macetas comunes con tierra estéril y perlita. Esta modificación permitió un mejor desarrollo de las plántulas las que crecieron en condiciones naturales (temperatura ambiente y riego cada 48 horas), en lugar de hacerlo en solución hidropónica. Después de 40 días, cuando las plantas estaban en pleno macollaje, se cosecharon.

Los bioensayos se llevaron a cabo en un invernáculo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Entre Ríos. La Figura 18 presenta una muestra de las macetas preparadas.



Figura 18. Macetas preparadas con los tres cultivares de arroz

El estudio fitoquímico de los extractos se realizó por triplicado y el análisis estadístico mediante ANOVA utilizando el programa InfoStat/P (Di Rienzo, 2010). Se realizó prueba de Tukey ($P < 0,05$) para determinar las diferencias entre medias y un análisis multivariado de componentes principales ($P < 0,05$) con el fin de visualizar mejor las diferencias químicas entre los cultivares sometidos a análisis fitoquímico.

3.5.1.1. Preparación de las muestras

Una vez cosechadas, las plantas se limpiaron a efectos de remover los restos de sustrato y, posteriormente, se secaron en una estufa a 40 °C con circulación forzada de aire. De cada cultivar se separaron las raíces de las partes aéreas, que se molieron por separado y se extrajeron en forma secuencial, primero con ciclohexano y luego con metanol. Con ambos solventes se realizaron tres maceraciones consecutivas a temperatura ambiente por espacio de 24 horas. Los extractos fueron concentrados a presión reducida hasta obtener un residuo sólido o siruposo utilizando un evaporador rotatorio (Büchi) y pesados en balanza analítica (Mettler) luego de haber sido secados en desecador al vacío hasta peso constante.

Considerando que muchos datos bibliográficos sobre aleloquímicos de arroz se relacionan con la raíz y sus exudados, y de acuerdo a lo propuesto en el proyecto de trabajo presentado oportunamente, se procedió al estudio fitoquímico de las raíces de los tres cultivares.

3.5.2. Procesos separativos

Los extractos fueron fraccionados utilizando diversas técnicas separativas, a saber: cromatografía en capa delgada (sílica gel), cromatografía de columna (CC), extracción en fase sólida (C-18), cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), cromatografía gas-líquido (CG). De cada extracto se pesaron 5 mg y disolvieron, en ciclohexano o metanol (1 ml), para su análisis mediante cromatografía en capa delgada utilizando las correspondientes reacciones cromogénicas durante el proceso de revelado. Para el análisis de derivados diterpénicos se utilizaron como fase móvil mezclas de ciclohexano:dioxano (7:3) y cloroformo:etanol (8:2). Los resultados de cada corrida cromatográfica se pusieron en evidencia rociando una solución de vainillina en sulfúrico concentrado como revelador, seguida de calentamiento a 110 °C. Para el análisis de los derivados fenólicos se utilizaron dos mezclas de solventes: acetato de etilo-metiletilcetona-ácido fórmico-agua en relaciones 5:3:1:1 y 10:3:1:1. Como revelador se utilizó el reactivo de Gibbs y posterior exposición a vapores de amoníaco. A continuación se describen los materiales empleados en cada una de estas técnicas:

a) Cromatografía en capa delgada

Se utilizaron las siguientes cromatoplasmas

- Sílicagel 60 F₂₅₄ sobre hojas de aluminio (Merck), espesor: 0,2 mm, con indicador de fluorescencia a longitud de onda 254 nm.
- Sílicagel de fase reversa C₁₈ sobre hojas de aluminio (Merck), espesor: 0,2 mm, con indicador de fluorescencia a longitud de onda 254 nm.

Los agentes reveladores fueron:

- Solución de vainillina 2% en H₂SO₄ concentrado y posterior calentamiento en estufa a 110 °C.

- Solución de 2,6-dicloroquinona-4-clorimida al 2% en cloroformo (Reactivo de Gibbs), y posterior exposición a vapores de amoníaco.

b) Cromatografía en columna

Las CC fue realizada en:

- columna de vidrio de long 15 cm x 1 cm d.i. utilizando Sephadex LH20 como fase estacionaria y metanol como solvente de elución.

La masa de fase estacionaria se estableció en base a la cantidad de muestra a procesar.

c) Extracción en fase sólida (EFS)

Se utilizaron cartuchos de Sílicagel C₁₈ (SPE ODS-C18, Agilent Technologies) de 500 mg (3 ml) y como solventes: H₂O, mezclas de MeOH-H₂O con porcentajes crecientes de MeOH y finalmente MeOH.

d) Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

Se utilizó un cromatógrafo de la serie 1100 Agilent Technologies, con una columna de fase reversa ZORBAX Eclipse XDB-C18, Analítica 4,6 x 150 mm, 5 μ m, (Agilent) utilizando un detector UV-Visible con lecturas a 255 y 270 nm.

Como fase móvil se utilizó un gradiente de solventes entre A y B. Solvente A = (Acetonitrilo-AcOH 0,1%), solvente B (Agua AcOH 0,1%), incrementando el porcentaje de A de 15 a 50% en el lapso de una hora. Se utilizaron solventes calidad para CLAR, acetonitrilo (Sintorgan SA) y agua Milli-Q.

e) Cromatografía gaseosa (CG)

Las cromatografías gaseosas fueron realizadas en un cromatógrafo 6890N Agilent Technologies (Agilent Technologies Inc., Wilmington, DE) con una detector de ionización de llama (FID).

Se utilizó una columna capilar HP-624 (60m x 0.25mm x 1,4 μ m), helio como gas portador y tetradecano como estándar interno. Condiciones cromatográficas: flujo 1.1 ml/min, programa de temperatura: inicial 100 °C 5 minutos, luego desde 100 a 280 °C con una rampa de 6 °C/min.

3.5.3. Métodos espectroscópicos

a) Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de RMN-¹H fueron realizados en cloroformo deuterado (CDCl₃) y metanol deuterado (CD₃OD) a 500 MHz, utilizando un espectrómetro Bruker AM 500 (UMIMFOR-FCEN-CONICET). Los desplazamientos químicos (δ) de las señales observadas se expresan en ppm respecto de la resonancia del tetrametilsilano (TMS) utilizado como referencia interna (0,00 ppm). Los espectros se procesaron utilizando un software estandar de Bruker.

b) Espectrometría de masa (EM)

Los espectros de masa de los aleloquímicos se obtuvieron acoplado al cromatógrafo 6890N Agilent Technologies (Agilent Technologies Inc., Wilmington, DE), a un detector de masa MS 5973 (Agilent Technologies, Inc.). El espectro de masa fue obtenido a 70 eV, realizando un escaneo de masa entre 40 y 560 u.m.a. La identificación de los compuestos no polares se realizó comparando los espectros de masa obtenidos con los de la base de

datos del software del espectrómetro (NIST Mass Spectral Database MS Serarchv.1.6d. 98. L). Las asignaciones se confirmaron por comparación con espectros de masa de estándares comerciales y/o con los datos previamente descritos en la literatura.

3.6. Análisis de los resultados

En el Cuadro 10 se observan los valores medios de las masas porcentuales de los extractos Ciclohexano y Metanol correspondientes a la parte aérea y radicular.

Cuadro 10. Valores medios de las masas de los extractos no polares (ciclohexano) y polar (metanol) expresados como porcentajes correspondiente al promedio de tres repeticiones (? ±DE)

	Extractos	Supremo 13	Bluebonnet 50	El Paso 144
Raíz	Ciclohexano	0,22±0,03 (a)	0,15±0,02 (b)	0,38±0,04 (c)
	Metanol	1,93±0,27 (a)	2,87±0,44 (b)	1,57±0,31 (c)
Aéreo	Ciclohexano	0,20±0,03	0,30±0,02	0,27±0,03
	Metanol	15,07±1,02	14,80±1,11	15,35±1,28

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Resultan notorias las diferencias entre las cantidades porcentuales extractos de raíz de los cultivares alelopáticos El Paso 144 y Bluebonnet 50, y no alelopático Supremo 13. El Paso 144 superó el doble de la cantidad de extracto no polar (ciclohexano) producida por Bluebonnet 50, y casi duplicó la proveniente de Supremo 13. El mismo tipo de contraste se observó en relación a la cantidad porcentual de extracto metanólico para Bluebonnet 50, que casi duplicó la correspondiente a El Paso 144, siendo además significativamente mayor que la proveniente de Supremo 13.

3.6.1. Análisis comparativo de extractos no polares de raíces

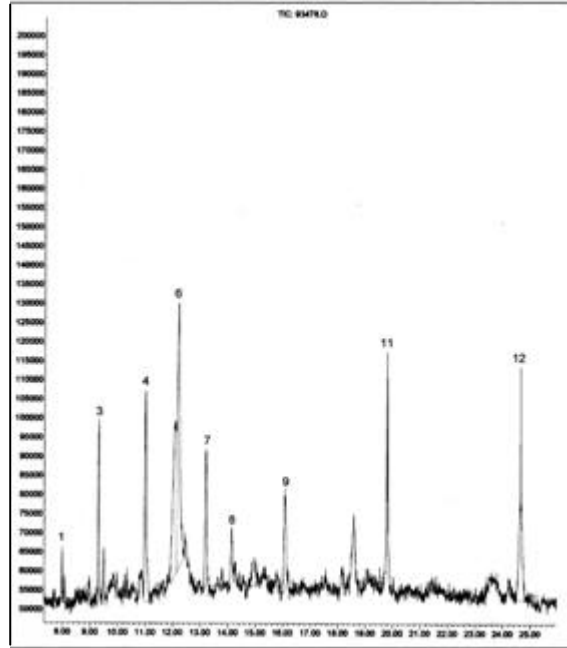
3.6.1.1. Resonancia magnética nuclear

El análisis preliminar de los extractos no polares (ciclohexano) se realizó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones. Los espectros de RMN-¹H mostraron señales características de hidrocarburos. A campos altos se observaron entre δ 0,8 y 0,95 ppm tripletes solapados correspondientes a los metilos terminales de las cadenas hidrocarbonadas. A δ 1,27 ppm se observó un singulete ancho de grandes dimensiones solapados a otras señales no resueltas, correspondientes a los grupos metilénicos de las cadenas hidrocarbonadas. A δ 2,05 ppm se observó la presencia de un singulete ancho característico del metilo de metilcetonas cuyas resonancias oscilan entre los δ 2,0 y 2,10 ppm según el entorno químico (Pretsch et al., 1989). Se observaron señales de baja intensidad a δ 3,2-3,5 ppm, sugiriendo la presencia de protones unidos a carbonos hidroxilados. A campos más bajos, entre δ 5,2 y 5,8 ppm, se observaron señales que sugieren la presencia de protones olefínicos.

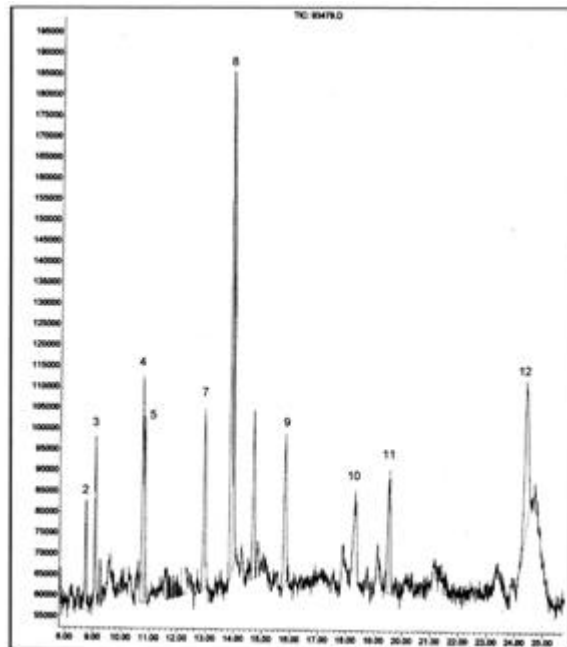
3.6.1.2. Cromatografía gaseosa

Los perfiles obtenidos por cromatografía gaseosa indican diferencias cuali y cuantitativas entre los extractos no polares de raíz de los tres cultivares. La Figura 19 muestra los cromatogramas de a) Bluebonnet 50 b) El Paso 144 y c) Supremo 13.

a)



b)



c)

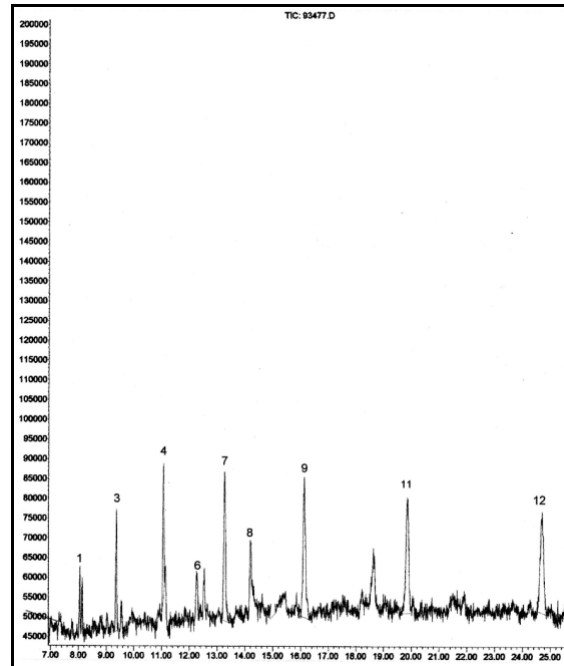


Figura 19. Perfiles cromatográficos (CG) de los extractos de ciclohexano no polares de raíces de a) Bluebonnet 50 b) El Paso 144 y c) Supremo13. (1) Heptadecano; (2) octadecanal; (3) octadecano; (4) nonadecano; (5) 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona; (6) Hexadecanoato de metilo; (7) eicosano; (8) Ac. hexadecanoico; (9) Heneicosano; (10) 8-heptil pentadecano; (11) docosano; (12) tricosano; (13) Compuestos oxigenados

En el Cuadro 11 se presentan los valores promedios, correspondientes a las tres repeticiones, de las abundancias relativas de los compuestos presentes en los extractos en ciclohexano de los tres cultivares (expresadas como porcentaje).

Cuadro 11. Abundancias relativas (%) de los compuestos identificados en raíces ($\bar{X} \pm DE$)

Compuesto	Supremo 13	El Paso 144	Bluebonnet 50
Heptadecano (1)	4,00±0,51(b)		2,28±0,29(a)
octadecanal (2)	-	5,27±0,43	-
octadecano (3)	7,06±0,71(a)	6,78±0,83 (a)	7,58±0,58(a)
nonadecano (4)	8,29±0,90(a)	9,72±0,79(a)	13,19±0,96(b)
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (5)	-	7,59±0,71	-
Hexadecanoato de metilo (6)	2,35±0,18(a)	-	26,01±0,97(b)
eicosano (7)	15,39±0,89(b)	9,87±0,54(a)	8,96±0,77(a)
Ac. hexadecanoico (8)	8,83±0,44(a)	25,63±0,92(b)	6,24±0,79(a)
Heneicosano (9)	18,28±1,19(b)	9,31±1,02(a)	8,14±1,11(a)
8-heptil pentadecano (10)	-	4,43±0,22	-
docosano (11)	17,94±0,94(b)	5,50±0,48(a)	14,00±0,79(b)
tricosano (12)	17,86±1,31(a)	15,80±1,09(a)	13,55±1,27(a)
Compuestos oxigenados	11,18±1,08(a)	38,49±2,05(b)	32,25±1,67(b)

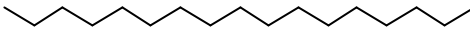
Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

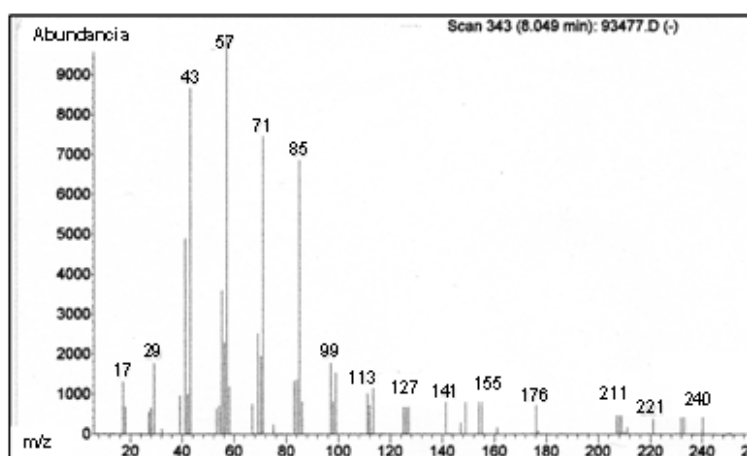
El cromatograma del extracto en ciclohexano de raíz de la variedad no alelopática Supremo (Figura 19c) muestra la presencia de hidrocarburos lineales como componentes principales. Heneicosano (18,28%), docosano (17,94%), tricosano (17,86%) y eicosano (15,39%) fueron identificados como compuestos mayoritarios. Se observa una baja proporción de dos derivados oxigenados, específicamente ácido hexadecanoico (palmítico) y su éster metílico con abundancias relativas de 8,83 y 2,35%, respectivamente.

Los mismos compuestos fueron detectados en el correspondiente extracto de raíz de Bluebonnet 50 (Figura 19a) aunque en proporciones significativamente diferentes. Se observó un notorio predominio del éster metílico del ácido hexadecanoico (26,01%), seguido en abundancia relativa por docosano (14,0%), tricosano (13,55%) y nonadecano (13,19%). Otros hidrocarburos lineales como heptadecano, octadecano, eicosano, además del ácido hexadecanoico, se presentaron en abundancias menores.

El extracto en ciclohexano de raíz de El Paso 144 (Figura 19b) presentó las mayores diferencias en metabolitos respecto a los identificados en los otros dos cultivares. Resulta notoria la presencia de cantidades significativamente mayores de compuestos oxigenados, siendo el ácido hexadecanoico el componente mayoritario con una abundancia relativa de 25,63%, seguido de tricosano (15,85%). Este extracto incluyó, a diferencia de los provenientes de los otros cultivares, dos compuestos oxigenados, un aldehído (octadecanal) y una cetona ramificada (6,10,14-trimetil-2-pentadecanona) con abundancias relativas de 5,27 y 7,59%, respectivamente. Estos dos compuestos y el hidrocarburo ramificado, 8-heptil-pentadecano (4,43%) sólo fueron detectados en el cultivar alelopático El Paso 144.


Del análisis del Cuadro 11 surge que los extractos no polares de ambos cultivares alelopáticos presentan proporciones significativamente superiores de derivados oxigenados, siendo El Paso 144 el representante extremo (38,59%), seguido por Bluebonnet 50 (32,34%) comparados con el no alelopático Supremo 13 que presentó una abundancia relativa baja (11,18%) de dichos componentes. A continuación (Figuras 20-31) se muestran los espectros de masa de los compuestos identificados por comparación con los correspondientes a patrones comerciales y/o con datos bibliográficos, acompañados de su fórmula y peso molecular.

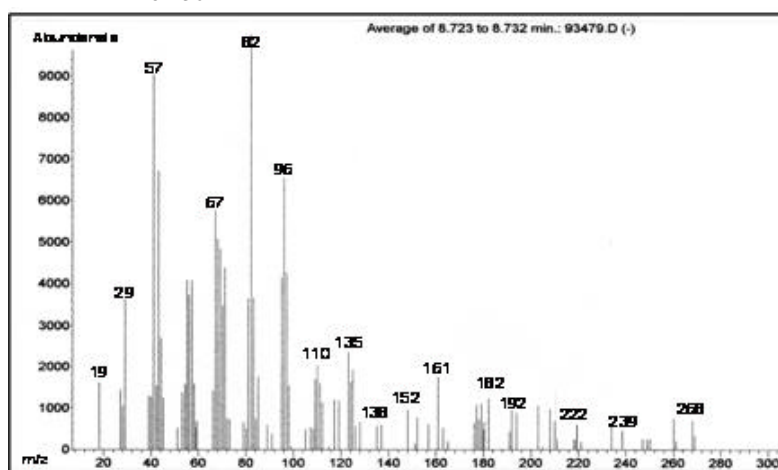
Heptadecano (1) 
 Fórmula Molecular: C₁₇H₃₆ Peso Molecular: 240



Abundancias relativas de los iones fragmentarios más representativos (*m/z*): 43 (86), 57 (100), 71 (82), 85 (70), 99 (16), 113 (12), 127 (10), 141 (11), 155 (10), 211 (5), 240 (6).

Figura 20. Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del heptadecano

Octadecanal (2) 
 Fórmula Molecular: C₁₈H₃₆O Peso Molecular: 268

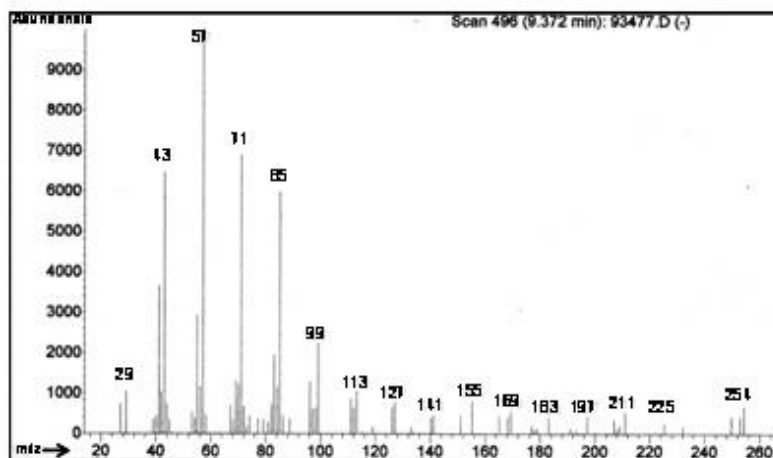
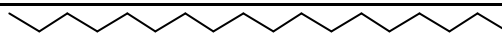


Abundancias relativas de los iones fragmentarios más representativos (*m/z*): 43 (90), 57 (40), 67 (60), 82 (100), 95 (63), 135 (22), 161 (18), 182 (16), 239 (6), 268 (8).

Figura 21. Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del octadecanal

 Octadecano (3)
Fórmula Molecular: $C_{18}H_{38}$

Peso Molecular: 254

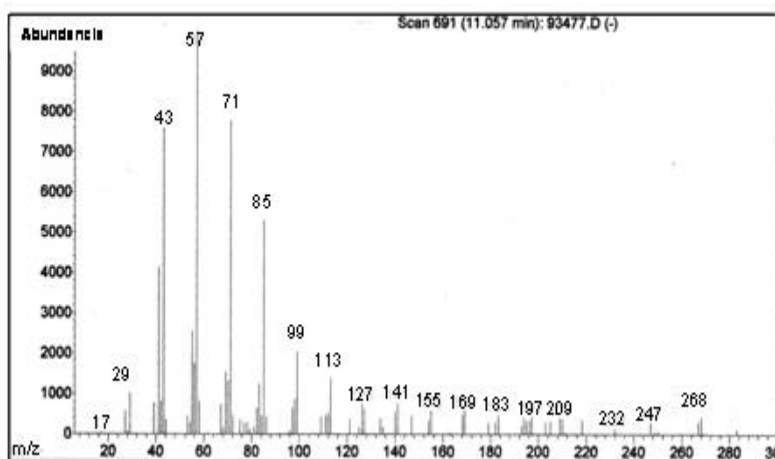
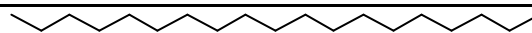


Abundancias relativas de los iones fragmentarios más representativos (m/z): 43 (77), 57 (100), 71 (76), 85 (62), 99 (21), 113 (11), 127 (8), 141 (6), 155 (8), 169 (6), 225 (2), 254 (6).

 Figura 22. Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del octadecano

 Nonadecano (4)
Fórmula Molecular: $C_{19}H_{40}$

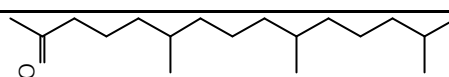
Peso Molecular: 268



Abundancias relativas de los iones fragmentarios más representativos (m/z): 43 (78), 57 (100), 71 (80), 85 (56), 99 (21), 113 (17), 127 (11), 141 (11), 155 (5), 183 (4), 197 (2), 268 (5).

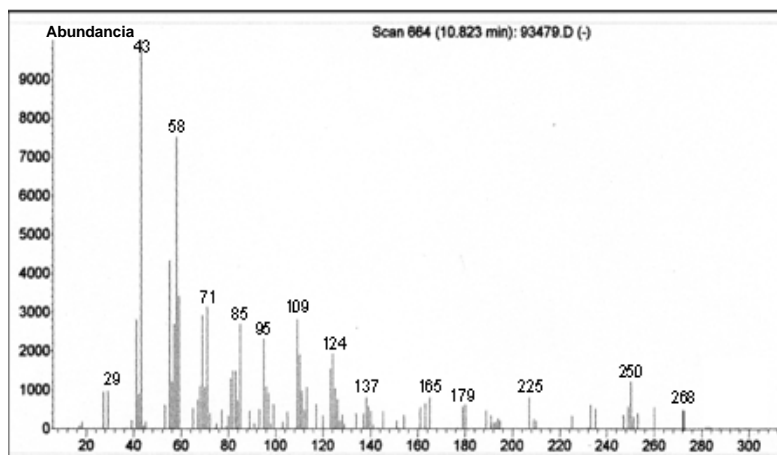
 Figura 23. Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del nonadecano

(6,10,14- trimetil)-2-pentadecanona (5)



Fórmula Molecular: $C_{18}H_{36}O$

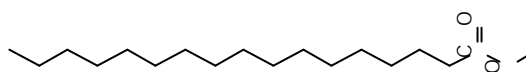
Peso Molecular: 268



Abundancias relativas de los iones fragmentarios más representativos (m/z): 43 (100), 58 (76), 71 (31), 85 (27), 99 (10), 109 (27), 124 (21), 179 (9), 225 (7), 250 (12), 268 (5).

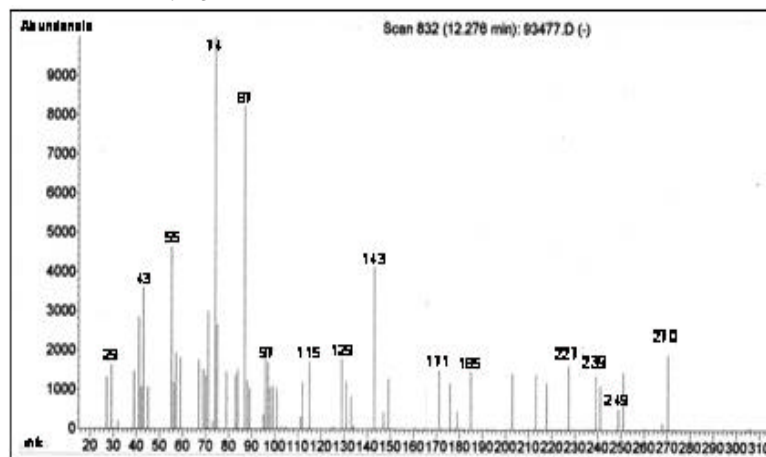
Figura 24. Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del (6,10,14- trimetil)-2-pentadecanona

Hexadecanoato de metilo (6)



Fórmula Molecular: $C_{17}H_{34}O_2$

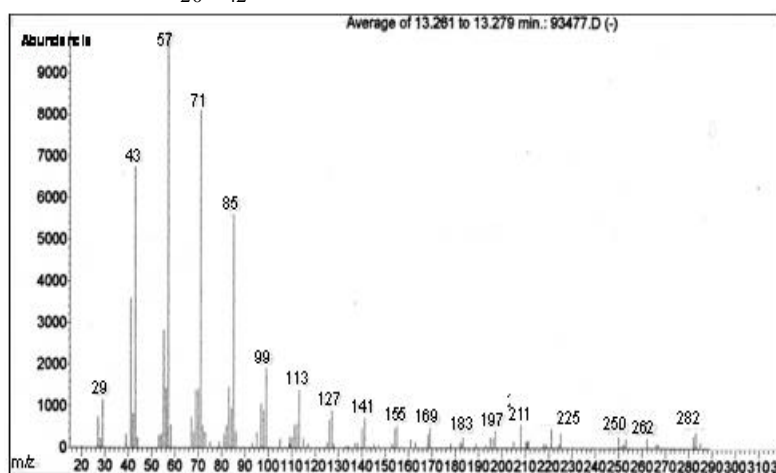
Peso Molecular: 270



Abundancias relativas de los iones fragmentarios más representativos (m/z): 43 (43), 55 (49), 71 (100), 87 (86), 97 (21), 129 (19), 143 (40), 171 (17), 185 (17), 211 (17), 239 (17), 270 (20).

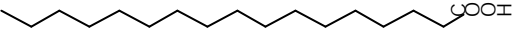
Figura 25. Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del hexadecanoato de metilo

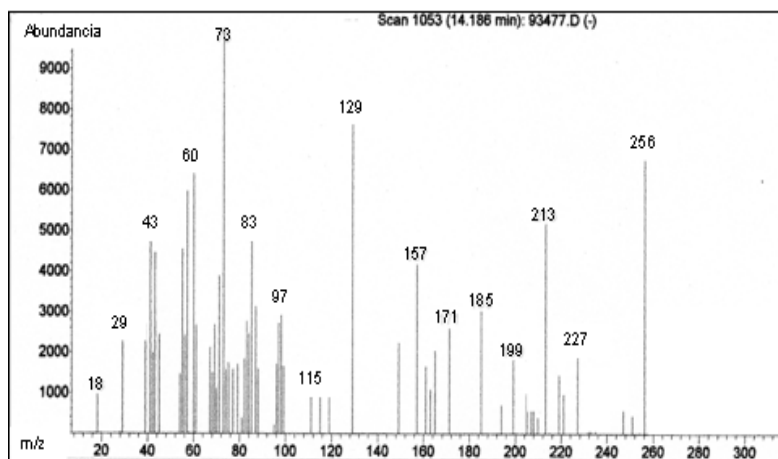
Eicosano (7) 
 Fórmula Molecular: C₂₀H₄₂ Peso Molecular: 282



Abundancias relativas de los iones fragmentarios (m/z): 43 (76), 57 (100), 71 (81), 85 (58), 99 (21), 113 (17), 127 (11), 141 (10), 155 (7), 197 (5), 262 (3), 282 (4).

Figura 26. Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del eicosano

Acido hexadecanoico (8) 
 Fórmula Molecular: C₁₆H₃₂O₂ Peso Molecular: 256

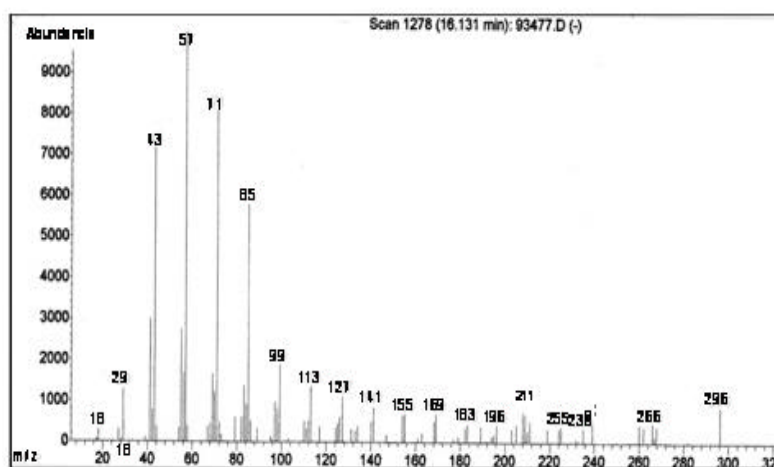
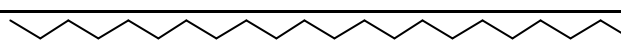


Abundancias relativas de los iones fragmentarios más representativos (m/z): 43 (48), 60 (62), 73 (100), 83 (49), 97 (31), 115 (11), 129 (79), 157 (43), 157 (42), 185 (28), 213 (51), 256 (63).

Figura 27. Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del ácido hexadecanoico

 Heneicosano (**9**)
Fórmula Molecular: $C_{21}H_{44}$

Peso Molecular: 296

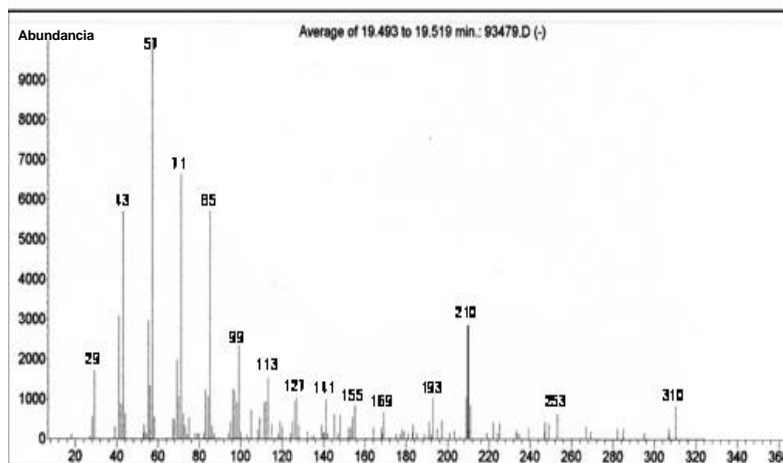
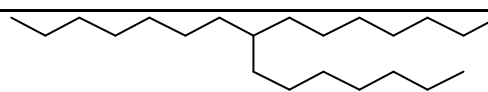


Abundancias relativas de los iones fragmentarios (m/z): 43 (71), 57 (100), 71 (81), 85 (58), 99 (20), 113 (16), 127 (12), 141 (9), 155 (7), 183 (4), 196 (3), 211 (6), 296 (8).

 Figura 28. Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del heneicosano

 8-heptil-pentadecano (**10**)
Fórmula Molecular: $C_{20}H_{46}$

Peso Molecular: 310



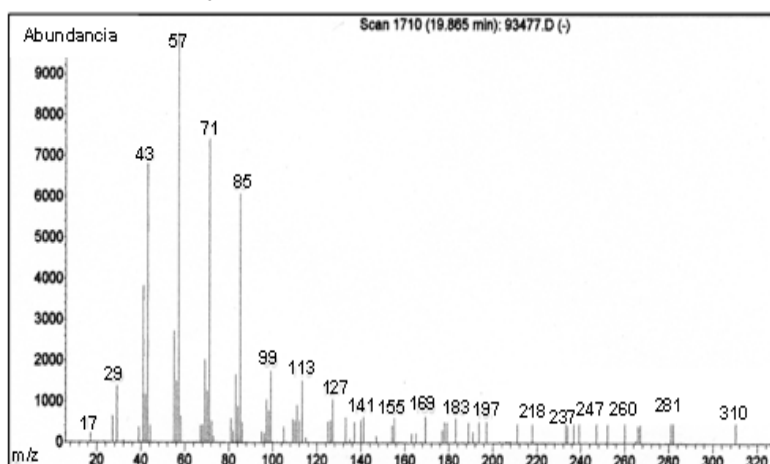
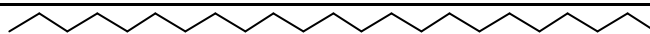
Abundancias relativas de los iones fragmentarios más representativos (m/z): 43 (59), 57 (100), 71 (67), 85 (60), 99 (22), 113 (18), 127 (13), 141 (11), 169 (7), 193 (11), 210 (30), 310 (9).

 Figura 29. Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del 8-heptil-pentadecano

Docosano (11)

 Fórmula Molecular: $C_{22}H_{46}$

Peso Molecular: 310



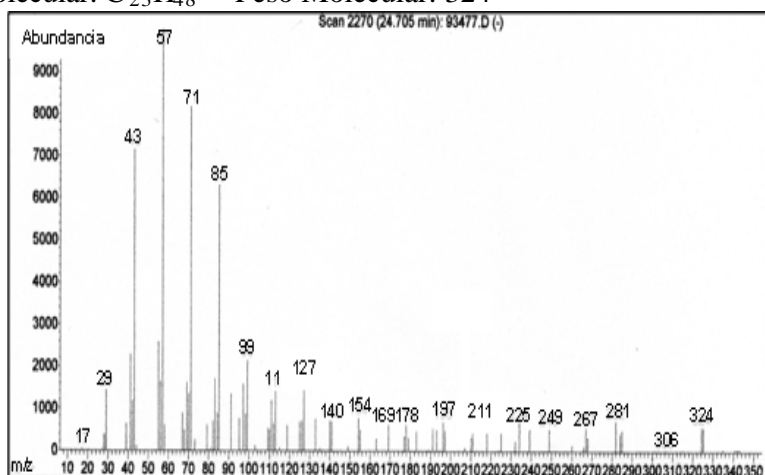
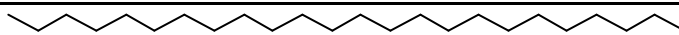
Abundancias relativas de los iones fragmentarios más representativos (m/z): 43 (67), 57 (100), 71 (73), 85 (61), 99 (17), 113 (15), 127 (9), 155 (5), 183 (5), 197 (4), 211 (4), 281 (4), 310 (4).

 Figura 30. Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del docosano

Tricosano (12)

 Fórmula Molecular: $C_{23}H_{48}$

Peso Molecular: 324

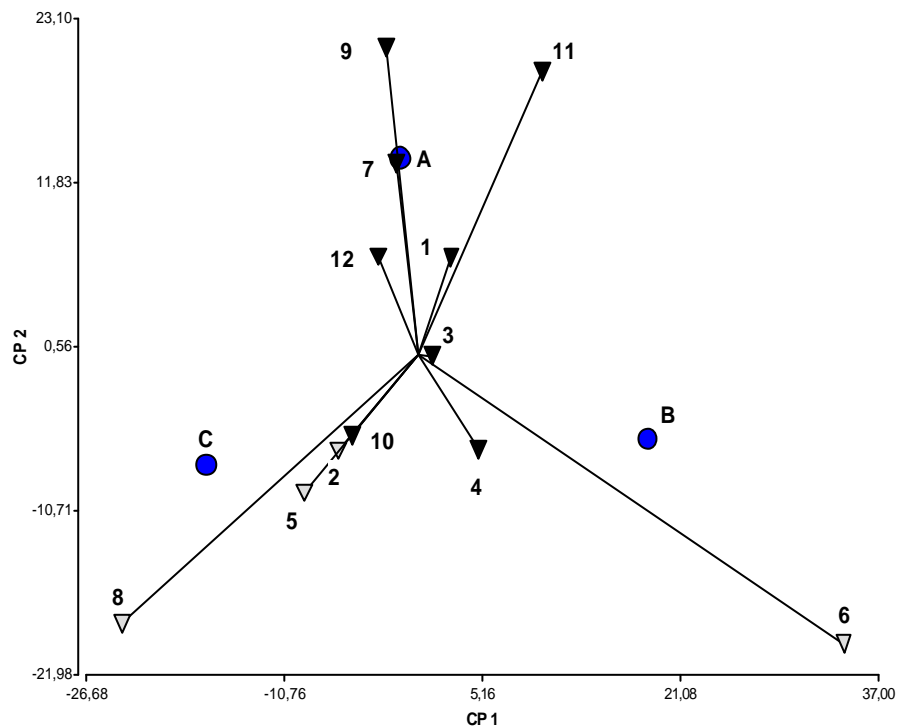


Abundancias relativas de los iones fragmentarios más representativos (m/z): 43 (71), 57 (100), 71 (81), 85 (63), 99 (21), 113 (14), 127 (17), 141 (7), 155 (7), 197 (6), 267 (5), 281 (7), 324 (6).

 Figura 31. Peso molecular, fórmula molecular y espectro de masa del tricosano

En las figuras anteriores pueden observarse las rupturas típicas de los hidrocarburos lineales en los espectros de masa de los compuestos heptadecano (1) octadecano (3) nonadecano (4), eicosano (7), heneicosano (9), docosano (11), y tricosano (12). El espectro de masa del compuesto 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (5) muestra mediante el ión m/z 225 la pérdida del 43 u.m.a. correspondiente al fragmento $\text{CH}_3\text{-CO}]^-$. El espectro de masa del 8-heptil-pentadecano (10) muestra una abundancia relativa elevada para el ión fragmentario de m/z 210 u.m.a. debido a la ruptura favorecida en el punto de ramificación de la estructura con pérdida de 99 u.m.a. El espectro de masa del hexadecanoato de metilo (6) mostró los iones fragmentarios a m/z 211 y 239 correspondientes a las pérdidas de $\text{CH}_3\text{O}]^-$ (31 u.m.a.) y $\text{COOCH}_3]^-$ (59 u.m.a.), ambas características de los espectros de masa de ésteres metílicos.

Se realizó el análisis de componentes principales (Di Rienzo, 2010), con el fin de encontrar posibles relaciones entre la composición química y la capacidad inhibitoria frente a *E. cruss-galli*. El análisis de componentes principales de los extractos no polares mostró que con los dos primeros componentes es posible explicar el 99% de la variabilidad total entre los tres cultivares. El Componente 1, que explicó el 70 % de la variabilidad, permite diferenciar a los tres cultivares entre sí, siendo los compuestos hexadecanoato de metilo (6), ácido hexadecanoico (8), y en menor medida docosano (11) y 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (5), los mayores responsables de esas diferencias.



● **Cultivares** A: Supremo 13 B: Bluebonnet 50 C: El Paso 144

1: heptadecano, 2: octadecanal, 3: octadecano, 4: nonadecano, 5: 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona, 6: hexadecanoato de metilo, 7: eicosano, 8: ácido hexadecanoico, 9: heneicosano, 10: 8-heptil-pentadecano, 11: docosano, 12: tricosano.

△ Compuestos oxigenados ▲ Compuestos no oxigenados

Figura 32. Análisis de componentes principales aplicado al promedio de la abundancia relativa de las tres repeticiones en los compuestos no polares en raíz de arroz

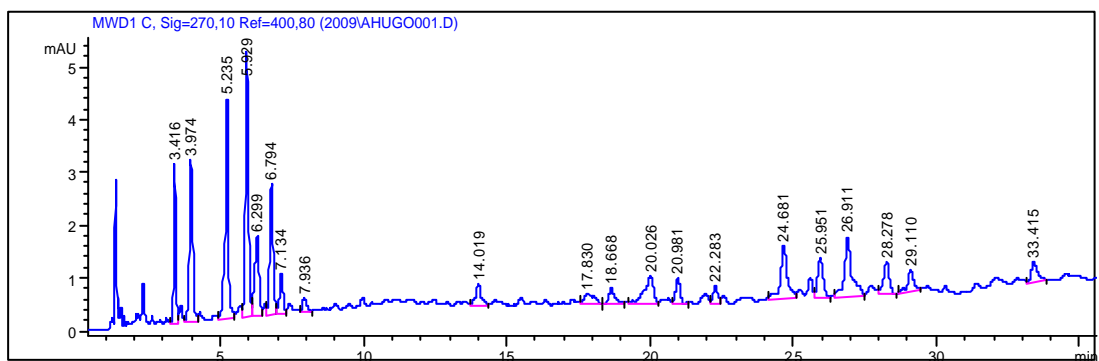
Estos resultados corroboran los datos presentados en el Cuadro 11, mostrando que el hexadecanoato de metilo (6), que no fue detectado en El Paso 144, es el componente mayoritario del cultivar Bluebonnet 50 (B). En cambio es el ácido hexadecanoico (8) el componente principal del extracto no polar de raíz de El Paso 144, cultivar que se caracteriza además por ser el único en incluir otros dos derivados oxigenados, la cetona 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (5) y el aldehído octadecanal (2). Resulta llamativo el predominio en los cultivares alelopáticos de dos componentes oxigenados, ácido hexadecanoico y hexadecanoato de metilo, que se caracterizan por estar estrechamente relacionados desde el punto de vista biosintético.

El Componente 2, que explica el 29% de la variabilidad total y permite diferenciar claramente los dos cultivares alelopáticos del que no lo es, separando con valores positivos a hidrocarburos lineales de cadena larga como el heneicosano (9), el docosano (11) y el eicosano (7), asociados a Supremo 13 (A), de los compuestos oxigenados como el hexadecanoato de metilo (6), el ácido hexadecanoico (8) y la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (5), que presentan los mayores valores negativos y están asociados a los cultivares alelopáticos Bluebonnet 50 (B) y El Paso 144 (C). Estos resultados sugieren que el carácter alelopático de los cultivares B y C podría estar asociado en parte a la presencia de derivados hidrocarbonados oxigenados.

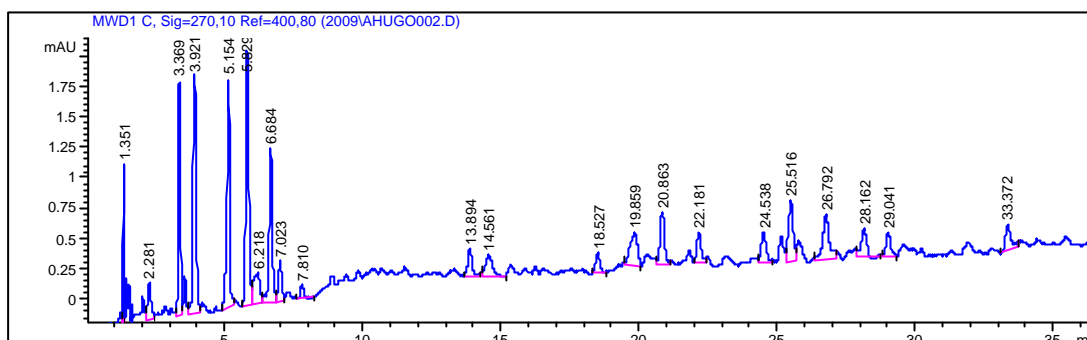
3.6.2. Análisis de los extractos polares

Previo al análisis por CLAR los extractos fueron purificados mediante extracción en fase sólida utilizando cartuchos SPE ODS-C₁₈. Se realizaron eluciones con agua destilada (3 x 3 ml) y luego con soluciones de metanol al 20% (3 x 3 ml). De esta manera azúcares y aminoácidos fueron eliminados del extracto para evitar su interferencia en el análisis. La muestra fue finalmente eluida de la fase estacionaria con metanol (4 x 3 ml), las alícuotas se juntaron y evaporaron a presión reducida hasta un volumen final de 1 ml. Cada extracto metanólico de raíz (5 µl) se analizó por CLAR de fase reversa y compararon los perfiles cromatográficos.

a)



b)



c)

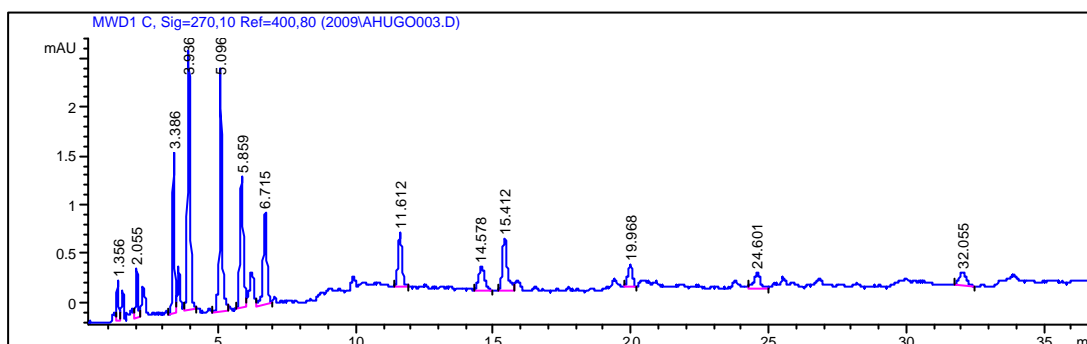
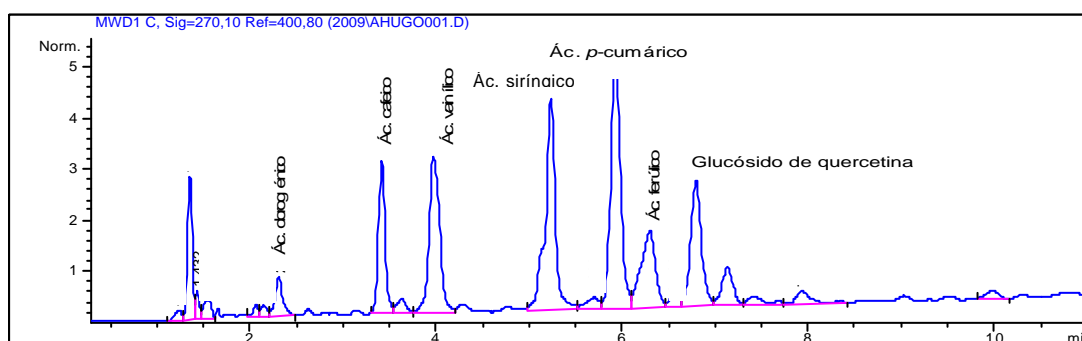


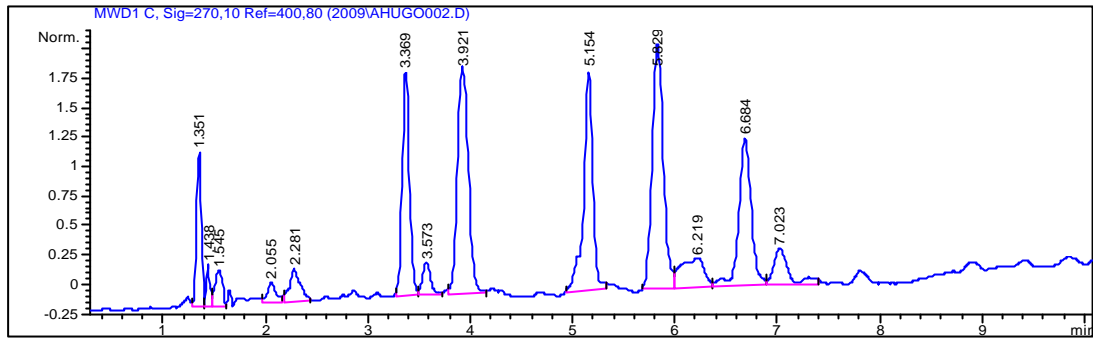
Figura 33. Perfiles cromatográficos de CLAR de los extractos metanólicos de raíz de a) Bluebonnet 50 b) El Paso 144 y c) Supremo 13.

Para una mejor comparación de los cromatogramas de los tres cultivares se analizaron por separado dos segmentos, correspondientes a señales hasta 10 minutos y señales entre 10 y 35 minutos, respectivamente.

a)



b)



c)

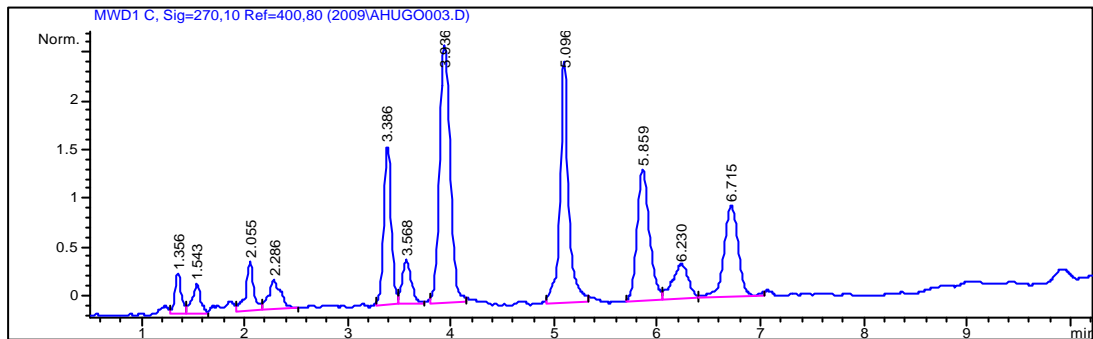


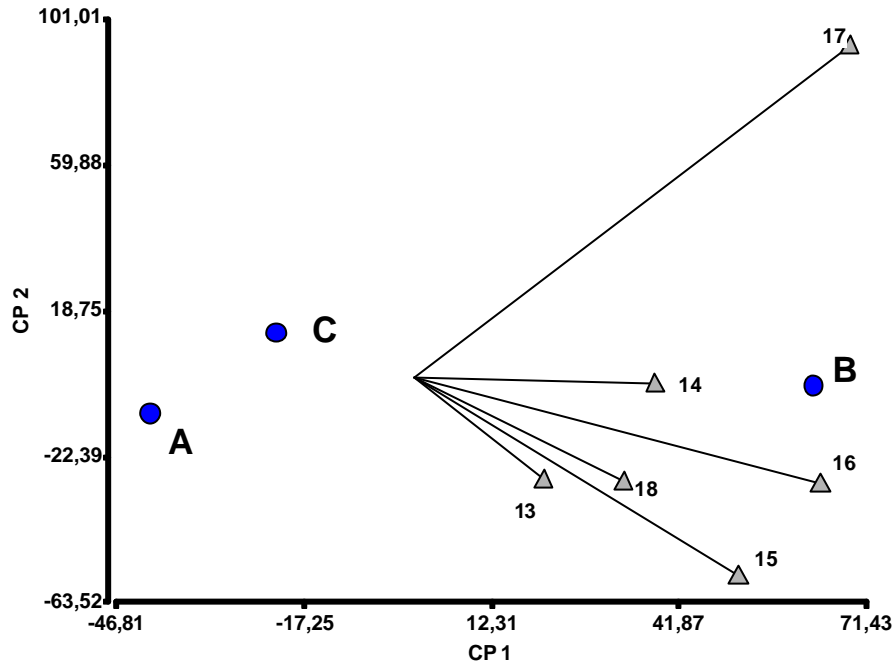
Figura 34. Cromatograma de CLAR (bajos tiempos de retención) de los extractos metanólicos de raíz de a) Bluebonnet 50 b) El Paso 144 y c) Supremo 13.

A bajos tiempos de retención (entre 2 y 10 minutos) se detectó, la presencia de derivados fenólicos, siendo los ácidos caféico, vanílico, siríngico, *p*-cumárico, ferúlico y clorogénico, los componentes cuyas abundancias relativas variaron significativamente entre cultivares (Cuadro 12, Figuras 34 a), b), c)) además del glucósido de quercetina, cuya abundancia relativa no presentó diferencias significativas entre los mismos. El extracto de Bluebonnet 50 presentó en el caso de muchos compuestos valores que duplican los encontrados en los correspondientes extractos de Supremo 13 y El Paso 144 (Figura 34 a), b), c)). Aún cuando las proporciones de los ácidos clorogénico y ferúlico fueron más bajas que las de otros derivados de los ácidos benzoico y cinnámico en los tres extractos, el correspondiente a Bluebonnet 50 presentó concentraciones casi tres veces superiores que las encontradas en los otros dos. Las cantidades de cada compuesto, expresadas en μg , se calcularon en base al área de cada pico extrapolando la concentración de la curva de calibración obtenida a partir de soluciones (10 a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$) de patrones comerciales.

Cuadro 12. Valor medio, de tres repeticiones, de la masa de ácidos fenólicos ($\mu\text{g g}^{-1}$ de raíz seca) ($X \pm \text{DE}$)

Ácido fenólico	Clorogénico (13)	Caféico (14)	Vanílico (15)	Siríngico (16)	<i>p</i> -cumárico (17)	Ferúlico (18)
Bluebonnet 50	27,1 \pm 1	99,2 \pm 1,1	112,0 \pm 2,0	127 \pm 1,5	126,0 \pm 1,8	38,2 \pm 0,7
El Paso 144	9,0 \pm 0,2	72,1 \pm 1	69,0 \pm 1,3	78,0 \pm 1,2	90,1 \pm 2,1	11,0 \pm 0,2
Supremo 13	11,1 \pm 0,2	66,2 \pm 1,1	71,1 \pm 1,1	73,0 \pm 1,0	58,0 \pm 1,0	11,0 \pm 0,3

El análisis de componentes principales aplicado a los ácidos fenólicos separó claramente el cultivar alelopático Bluebonnet 50 de los otros dos.



● Cultivares A: Supremo 13 B: Bluebonnet 50 C: El Paso 144
 13: ác. clorogénico, 14: ác. cafeico, 15: ác. vanílico, 16: ác. sirínigico, 17: ác. *p*-cumárico, 18: ác. ferúlico

Figura 35. Análisis de Componentes Principales aplicado a los valores medios de los ácidos fenólicos identificados de raíces secas de los cultivares A, B y C.

El análisis de componentes principales de los derivados fenólicos de los extractos polares mostró que con los dos primeros componentes es posible explicar el 100% de la variabilidad entre cultivares, separando a Supremo 13 (A) y El Paso 144 (C) de Bluebonnet 50 (B). El Componente 1, que explicó el 96% de la variabilidad, permite diferenciar a Bluebonnet 50 siendo los compuestos más asociados a estas diferencias los ácidos *p*-cumárico (17), sirínigico (16) y vanílico (15), que presentaron los mayores valores positivos. Estos resultados confirman la presencia de abundancias relativas significativamente mayores de derivados de los ácidos cinámico y benzoico en Bluebonnet 50 (Cuadro 12), cultivar que produjo además una cantidad relativa de extracto metanólico que duplicó la producida por de los otros cultivares (Cuadro 10). El Componente 2 explica el 4% de la variabilidad y se encuentra asociado principalmente al ácido *p*-cumárico (17) (Figura 35).

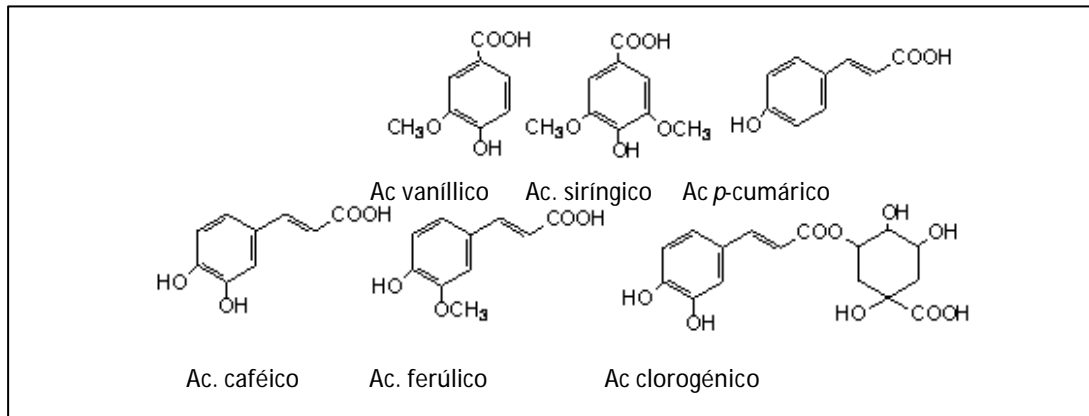
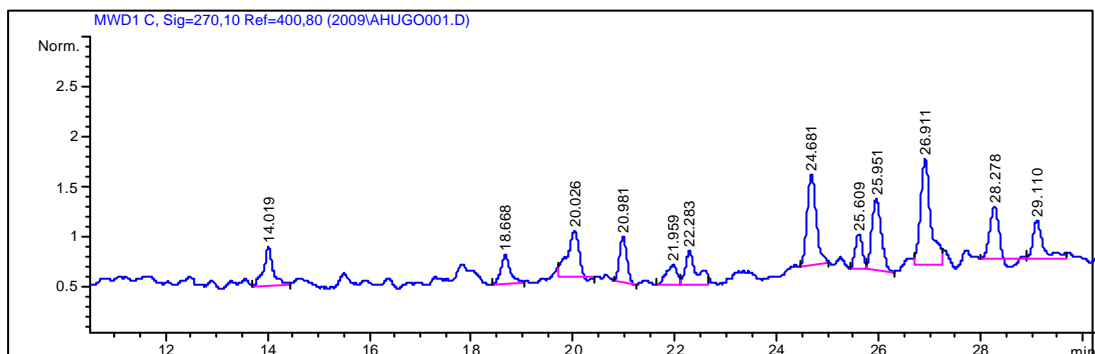


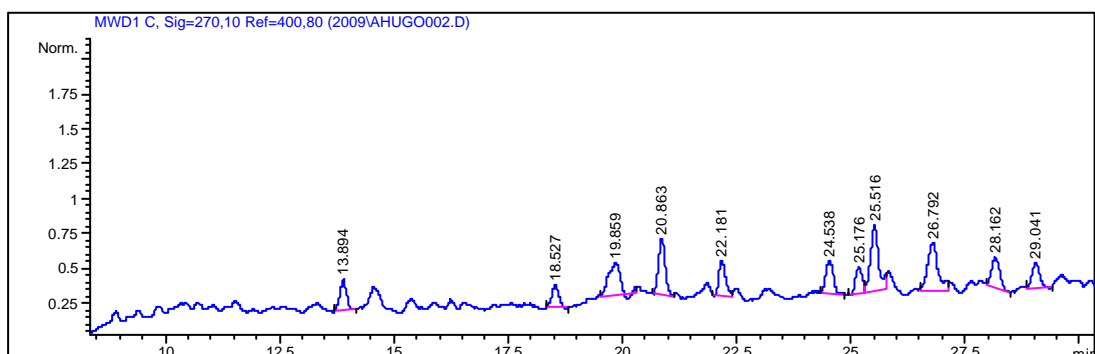
Figura 36. Derivados fenólicos identificados en los extractos metanólicos de raíz de los cultivares A, B y C.

A tiempos de retención superiores se observaron las mayores diferencias entre los tres extractos, mostrando los cultivares alelopáticos un número apreciablemente mayor de picos

a.)



b.)



c)

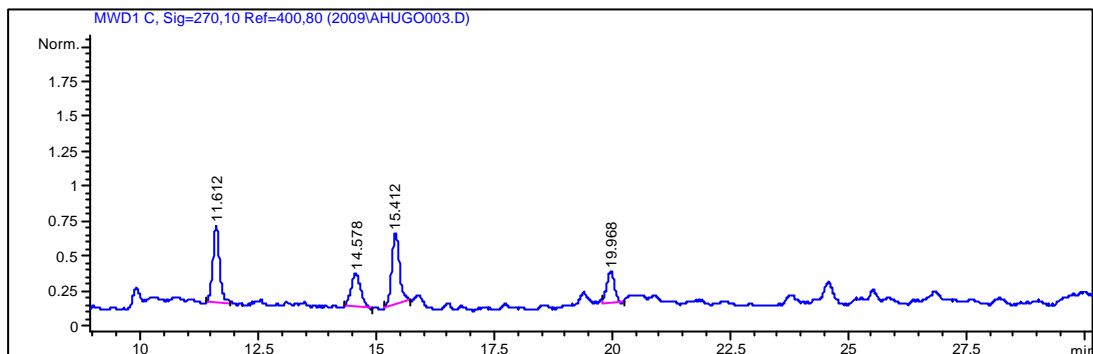


Figura 37. Cromatograma de CLAR (mayores tiempos de retención) de los extractos metanólicos de raíz de a) Bluebonnet 50 b) El Paso 144 y c) Supremo 13.

Al analizar los datos de grupos de investigación que han trabajado previamente en relación a aleloquímicos de arroz en otros países, hemos mencionado datos bibliográficos sobre el rol de derivados di y triterpenoidales en la actividad alelopática de los cultivares de arroz más activos. Se trata de derivados menos polares que han sido previamente aislados de la sub-fracción menos polar del extracto metanólico (Rimando et al., 2001), y cuyos tiempos de retención estarían en la zona por encima de los 10 minutos en las condiciones utilizadas para la realización de los CLAR. Resultó notoria la coincidencia de señales entre los cultivares alelopáticos al comparar las zonas de altos tiempos de retención, que presentaron, sin embargo diferencias significativas en su abundancia relativa.

Con el fin de separar este tipo de compuestos del extracto metanólico de las raíces de arroz de los tres cultivares en estudio, se realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo. Cada extracto (60 mg) en agua (15 ml) fue particionado con acetato de etilo (3 x 10 ml). Los extractos se secaron con Na_2SO_4 anhidro, evaporaron a sequedad a presión reducida y secaron en desecador hasta peso constante, obteniéndose así las sub-fracciones en acetato de etilo de los extractos metanólicos de los tres cultivares (Supremo 13 = 3,1 mg, Bluebonnet 50 = 5,6 mg y El Paso 144 = 8,1 mg). El análisis por CCD de las mismas mostró diferencias cualitativas entre los cultivares alelopáticos y el no alelopático. Los cromatogramas correspondientes a los dos primeros mostraban una secuencia de manchas relativamente intensas por revelado con vainillina, que caracterizan la presencia de derivados de tipo terpenoidal y/o esteroidal, pocas manchas de este tipo resultaron apenas detectables en la correspondiente sub-fracción de Supremo 13.

La baja masa de las sub-fracciones en acetato de etilo impidió la posterior purificación y aislamiento de los aleloquímicos de cada cultivar por separado. Cada una de ellas fue sometida a un análisis preliminar mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear ($\text{RMN-}^1\text{H}$).

Los espectros de $\text{RMN-}^1\text{H}$ realizados en CD_3OD a 500 MHz mostraron señales poco definidas debido a la complejidad del extracto. Sin embargo pudo observarse a campos altos, (d 0,8 – 1,4 ppm) señales correspondientes a los grupos metilos (singuletes y dobletes) solapados que podrían pertenecer a los esqueletos esteroidales y/o

diterpenoidales. Entre δ 1,4 y 2,5 ppm se observaron señales poco definidas correspondientes a los hidrógenos metilénicos. Entre δ 3,1 y 4,0 ppm se observaron señales que podrían corresponder a protones unidos a carbonos hidroxilados, relacionados con la presencia de estructuras diterpénicas o glicósídicas. A campos bajos (δ 5,0 – 6,0 ppm) se observaron señales de enlaces olefínicos. El conjunto de señales permitiría suponer la existencia de derivados diterpénicos biosintéticamente relacionados como fitocasanos, oryzalexinas y/o momilactonas, previamente identificadas en cultivares alelopáticos de arroz (Serido et al., 1986; Koga et al., 1995).

Con el fin de tratar de identificar los componentes mayoritarios de este tipo, cuya abundancia relativa se había evidenciado por CCD como notoriamente superior en los cultivares alelopáticos, se avanzó en el proceso de separativo de las sub-fracciones en acetato de etilo de los mismos (El Paso 144 y Bluebonnet 50). La baja masa disponible de las mismas, las mínimas concentraciones en que los metabolitos están presentes en ellas y la imposibilidad de acceder a patrones comerciales de fitoalexinas de arroz, determinó la decisión de juntarlas con el fin de contar con masa suficiente para confirmar la presencia de este tipo de compuestos en las mismas. Se partió de un total de 13,7 mg de sub-fracción acetato de etilo (El Paso 144 + Bluebonnet 50).

En esta etapa de purificación se empleó una columna de Sephadex LH-20 utilizando metanol como solvente de elución. La muestra se sembró disuelta en 0,4 ml de metanol y se ajustó la velocidad de flujo de la fase móvil a 0,4 ml por minuto. Se recolectaron fracciones de 5 ml. El desarrollo de la columna se siguió mediante cromatografía en capa delgada de sílica gel utilizando los sistemas de solventes (cloroformo:etanol 97:3) y vainillina como revelador. Los tubos que presentaron perfiles cromatográficos semejantes se juntaron y evaporaron a presión reducida hasta sequedad. Se obtuvieron tres fracciones: A (5,1 mg); B (1,6 mg) y C (2,1 mg) que analizadas por cromatografía en capa delgada de alta resolución, mostraron manchas que podrían asociarse a la presencia de derivados terpenoidales, que coincidieron en R_f y color con lo descrito por Matsuyama (1983) utilizando el mismo revelador, para las momilactonas A (R_f 0,47 color púrpura) y B (R_f 0,38 color azul)

Las fracciones A, B y C se analizaron mediante espectroscopía de RMN ^1H y ^{13}C utilizando CD_3OD como solvente deuterado. Los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C de la fracción A mostraron señales que podrían corresponder con las informadas por Chung et al. (2005) para el β -sitosterol-3-*O*- β -*D*-glucopiranosido (Cuadro 13, Figura 38).

Cuadro 13. Valores de RMN ^1H y ^{13}C observados comparados con datos bibliográficos correspondientes al sitosterol-3-*O*- β -*D*-glucopiranosido.

Posición	Fracción A		? -sitosterol-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopiranosido	
	d ^1H (ppm)	d ^{13}C (ppm)	d ^1H (ppm)	d ^{13}C (ppm)
3	3,63 (m)	72,2	3,51 (m)	71,8
5		141,1		140,7
6	5,40 (m)	125,1	5,50 (sa)	122,0
18	0,75 (s)	14,1	0,70 (s)	13,0
19	0,97 (s)	19,1	0,94 (s)	19,4
21	0,94 (d)	18,3	0,92 (d)	18,8
26	0,80 (d)	19,7	0,81 (d)	19,5
27	0,88 (d)	19,3	0,91 (d)	19,0
29	0,91 (t)	14,8	0,88 (t)	13,0
1'	4,24 (d)	104,3	4,35 (d)	103,8
2'		75,4		75,8
3'		77,4		78,2
4'		72,0		71,8
5'		78,1		78,8
6'	3,75; 3,52 (m)	63,1	3,80; 3,56 (m)	65,5

Entre paréntesis se expresa la multiplicidad de la señal.

Datos bibliográficos: Chung et al. (2005)

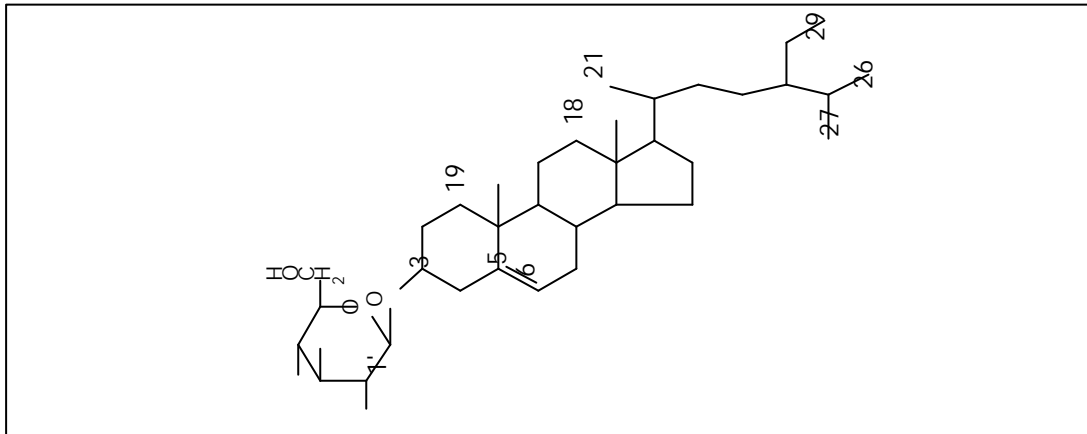


Figura 38. Estructura química del β -sitosterol-3-*O*- β -*D*-glucopiranosido

El Cuadro 13 detalla la asignación más probable de señales del espectro de RMN- ^1H de la fracción A. A bajos valores de desplazamiento químico, d 0,75 y 0,97 ppm, aparecieron señales que podrían corresponder a los metilos 18- CH_3 y 19- CH_3 . Estos singuletes se presentaron solapados con dobletes a d 0,80, 0,88 y 0,94 ppm que podrían asociarse a los grupos metilos de la cadena lateral del núcleo esteroidal (21- CH_3 , 26- CH_3 , 27- CH_3). La señal del 29- CH_3 se observó como triplete a d 0,91 ppm. En el espectro de RMN- ^{13}C se observaron entre d 14,1 – 19,7 ppm seis señales que podrían corresponder a los metilos 18-, 19-, 21-, 26-, 27- y 29- CH_3 .

Las señales de los espectros de RMN- ^1H entre d 3,11 y 4,40 ppm y de RMN- ^{13}C entre d 63,1 y 104,3 ppm podrían provenir de una unidad de monosacárido en su forma piranósica. En este rango de señales se encuentran también los desplazamientos químicos

del 3-H y 3-C, por ser el punto al cual se une la unidad de monosacárido al núcleo esteroidal.

La señal del protón unido al carbono anomérico resuena a δ 4,24 ppm como doblete con una constante de acoplamiento de 8 Hz, valor que es característico de los anómeros β en monosacáridos de la serie D, y la señal de dicho carbono (C1') se observa en el espectro de RMN ^{13}C a δ 104,3 ppm.

A desplazamientos químicos superiores se observaron en el espectro de RMN- ^1H (δ 5,40 ppm) y en el de RMN- ^{13}C (δ 125,1 y 141,1 ppm) señales propias de un doble enlace. Estas señales parecen coincidir con las informadas por Chung et al. (2005) para el doble enlace γ^5 . Si bien la asignación de señales realizada por comparación con datos bibliográficos no es completa, las coincidencias señaladas sugerirían la presencia de un glicósido esteroidal derivado del sitosterol en la fracción A.

Los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C de las fracciones B y C mostraron señales poco definidas, debido a la baja masa y a la complejidad de las mezclas presentes en las mismas. Por tal motivo el trabajo para estas fracciones también se limitó a la búsqueda y comparación con datos bibliográficos, de las señales de RMN- ^1H y ^{13}C más características de las fitoalexinas presentes en arroz, siendo las momilactonas A y B las más relevantes (Figura 39).

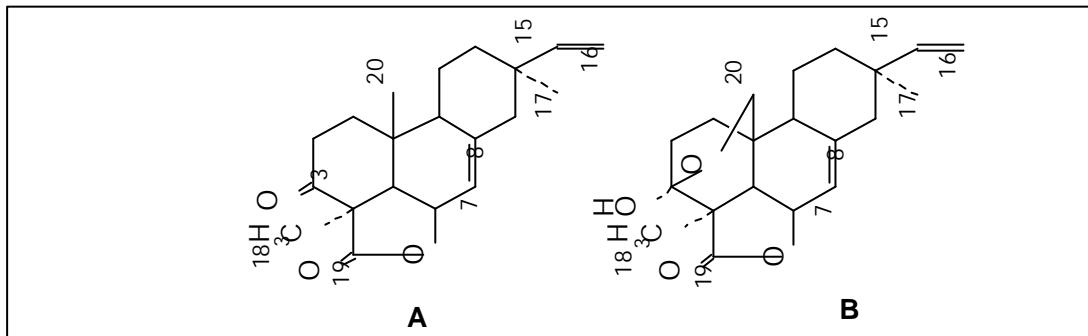


Figura 39. Estructura química de las momilactonas A y B

En el espectro de RMN ^1H de la fracción B pudieron distinguirse singuletes a δ 0,91 y 1,30 ppm que podrían corresponder a los metilos 17- CH_3 y 18- CH_3 de la estructura diterpénica de la momilactona B. Entre δ 4,90 y 5,85 ppm se observaron señales características de dobles enlaces. La momilactona B posee dos dobles enlaces carbono carbono (γ^7 y γ^{15}) cuyos valores de desplazamiento químico son semejantes a los informados por Chung et al. (2005). En el espectro de RMN- ^{13}C se observaron señales a δ 17,4; 21,0; 95,5; 109,9; 114,0; 146,2 y 150,2 ppm que comparados con datos de la bibliografía podrían corresponder a las señales de los metilos 18- CH_3 , 17- CH_3 , y los carbonos en posición C-3, C-16, C-7, C-8 y C-15, respectivamente. Una señal a δ 181,1 ppm apenas distinguible podría corresponder a un carbono carbonílico de lactona (C-19) presente en la momilactona B. En el Cuadro 14 se muestran los valores de RMN ^1H y ^{13}C observados comparados con datos bibliográficos informados para la momilactona B (Chung et al., 2005).

Cuadro 14. Valores de RMN ^1H y ^{13}C correspondientes a la momilactona B

Posición	Fracción B		Momialactona B	
	d ^1H (ppm)	d ^{13}C (ppm)	d ^1H (ppm)	d ^{13}C (ppm)
1			1,71; 1,77 (m)	28,6
2			2,10; 1,87 (m)	27,4
3		95,5		96,7
4				50,9
5			2,38 (d)	44,4
6	4,96 (m)		5,00 (dd)	73,8
7	5,58 (d)	114,0	5,67 (d)	114,1
8		146,2		146,7
9			1,53 (m)	42,9
10				30,6
11			1,36; 1,74 (dd)	24,6
12			1,56 (m)	37,2
13				39,9
14			2,01; 2,15 (dd)	48,6
15	5,85 (m)	150,2	5,86 (dd)	149,3
16	4,90 (m)	109,9	5,00; 4,90 (dd)	109,2
17	0,91 (s)	21,0	0,90 (s)	21,1
18	1,30 (s)	17,4	1,39 (s)	17,7
19		181,1		180,6
20			4,00; 3,57 (dd)	72,6

Entre paréntesis se expresa la multiplicidad de la señal.

Datos bibliográficos: Chung et al. (2005)

Al comparar las señales del espectro de RMN- ^1H de la fracción C con datos publicados para la momilactona A se podría relacionar los singuletes a d 0,91; 0,92 y 1,45 ppm, con los metilos de las posiciones 17- CH_3 , 20- CH_3 y 18- CH_3 de la estructura diterpénica, respectivamente, sin embargo dichas señales se observaron solapadas con otras de menor intensidad y diferente multiplicidad. Las señales entre d 5,00 y 5,80 ppm podrían corresponder a los dobles enlaces γ^7 y γ^{15} , aunque no llega a distinguirse el número y multiplicidad de las mismas. En el espectro de RMN- ^{13}C se observaron señales a d 22,0; 21,1 y 22,0 ppm que podrían corresponder a los metilos 17- CH_3 , 18- CH_3 y 20- CH_3 , respectivamente. Se observaron señales de dobles enlaces cuyos carbonos resuenan a d 109,0, 114,0 y 151,2 ppm. A campos bajos se observó también una señal a d 176,2 que podría corresponder a un carbonilo de lactona. Al no poder observar con certeza la señal del carbonilo cetónico a desplazamientos químicos próximos a d 206 – 208 ppm no es posible asegurar la presencia de momilactona A, aunque cabe aclarar que en dicha fracción no se observa la señal a desplazamientos químicos próximos a d 95 – 97 ppm propia del C-3 de la momilactona B. En el Cuadro 15 se muestran los valores de desplazamiento químico de RMN- ^1H y ^{13}C comparados con datos bibliográficos informados para la momilactona A (Chung et al., 2005).

Cuadro 15. Valores de desplazamiento químico de RMN-¹H y ¹³C de la fracción C correspondientes a la momilactona A.

Posición	Fracción C		Momilactona A	
	d ¹ H (ppm)	d ¹³ C (ppm)	d ¹ H (ppm)	d ¹³ C (ppm)
1			2,03; 1,61 (m)	31,7
2			2,65; 2,54 (m)	35,5
3				208,5
4				55,2
5			2,55 (d)	47,1
6	5,00		4,98 (dd)	78,3
7	5,80	114,0	5,75 (d)	115,1
8				149,8
9			1,86 (m)	51,5
10				33,6
11			1,43; 1,77 (dd)	25,1
12			1,60 (m)	38,8
13				41,3
14			2,06; 2,23 dd	48,7
15	5,80	151,2 (d)	5,89 dd	150,6
16	5,00	109,0	5,00; 4,92 dd	110,4
17	0,91 (s)	22,0	0,93 (s)	22,4
18	1,45 (s)	21,1	1,50 (s)	21,6
19		176,2		177,4
20	0,91 (s)	22,0	0,93 (s)	22,2

Entre paréntesis se expresa la multiplicidad de la señal.

Datos bibliográficos: Chung et al. (2005)

La presencia de un elevado número de picos que no pudieron ser asignados en los perfiles de CLAR y la complejidad de los espectros de RMN de las fracciones A, B y C de los cultivares alelopáticos, entre los 14 y 30 minutos, sugieren que otras fitoalexinas biosintéticamente relacionadas con las momilactonas (fitocasanos y oryzalexinas) podrían también estar presentes (Toyomasu et al., 2008).

3.7. Discusión

3.7.1. Componentes no polares

Cuando los extractos se analizaron por cromatografía gaseosa y cromatografía gaseosa-espectrometría de masas pudieron establecerse las diferencias entre ellos. Si bien los tres cultivares presentaron similitud en cuanto a algunos componentes no polares, se observaron diferencias en las abundancias relativas de los mismos. Entre los componentes mayoritarios del extracto no polar de Supremo 13, predominaron los hidrocarburos lineales (heneicosano, docosano, tricosano y eicosano), con menores proporciones de hexadecanoato de metilo y del ácido hexadecanoico libre, únicos compuestos oxigenados detectados en este extracto (11,18±1,08%). Comparativamente los extractos de Bluebonnet 50 y El Paso 144 presentaron una mayor proporción de derivados oxigenados con porcentajes del 32,34±1,67% y 38,58±2,05%, respectivamente. Bluebonnet 50 mostró la mayor concentración de hexadecanoato de metilo (26,01±0,97%), y baja proporción del ácido hexadecanoico (6,24±0,79%), a diferencia de lo que se observa en el cultivar El Paso 144, donde este último compuesto alcanza el 25,63±0,92% sin detectarse la presencia de su éster metílico. El aldehído (octadecanal) y la cetona (6,10,13-trimetil-2-pentadecanona)

solo se detectaron en el El Paso 144. Es la primera vez que esta cetona se informa entre los componentes de un extracto de raíz de arroz.

La presencia de hidrocarburos y algunos ácidos derivados ha sido previamente señaladas por Kim y Kim (2000) en los exudados radicales del cultivar alelopático Kouketsmochi, donde determinaron hidrocarburos y alcoholes lineales así como ácidos y ésteres (9,12-octadecadienoico, hexadecanoato de metilo, octadecanoato de metilo, 12-metil-tridecanoato de metilo). Estos autores plantearon que aunque las concentraciones de estos metabolitos son bajas y su actividad inhibitoria relativamente débil, pueden actuar en forma sinérgica como aleloquímicos de arroz. He et al. (2006) confirmaron este planteo luego de analizar exudados radicales de 25 cultivares de arroz, estableciendo que su actividad alelopática estaba relacionada con la presencia de ésteres, aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos y ácidos orgánicos, además de derivados terpénicos.

El cultivar alelopático El Paso 144 ha demostrado incluir en sus raíces (extracto ciclohexano) el doble de masa relativa de componentes no polares que los otros cultivares diferenciándose además de ellos en la producción exclusiva de derivados oxigenados (6,10,14-trimetil-2-pentadecanona y octadecanal) acompañando a una abundancia mucho mayor de ácido hexadecanoico que en este cultivar representa la cuarta parte de su composición porcentual. Esta característica química de El Paso 144, podría explicar en parte su actividad inhibitoria de la germinación y crecimiento de plántulas de *Echinochloa crus-galli*, particularmente si se tiene en cuenta que la presencia de esta maleza parece estimular una mayor producción de aleloquímicos por parte de cultivares alelopáticos de arroz (Kong et al., 2006).

3.7.2. Componentes polares

En nuestro estudio se detectaron los mismos derivados fenólicos en los tres cultivares analizados, aunque se registraron mayores abundancias relativas en el cultivar Bluebonnet 50, que en la mayoría de los casos duplicó las correspondientes a los mismos compuestos en los cultivares El Paso 144 y Supremo 13. Los ácidos fenólicos cafeíco, vanílico, siríngico, *p*-cumárico, ferúlico y clorogénico, fueron los derivados de ácidos fenólicos mayoritarios en los tres casos, también se detectó la presencia del glucósido de quercetina. Ácidos fenólicos como *p*-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico, *p*-cumárico y ferúlico han sido identificados entre los aleloquímicos más comunes del arroz (Rice, 1984; Mattice, et al., 1998; Chung et al., 2001; Rimando et al., 2001; Seal et al., 2004 a,b).

La importancia de los compuestos fenólicos como aleloquímicos en el ecosistema del arroz ha sido señalada por Mattice et al. (1998), quienes sugirieron que la alelopatía de arroz sobre las malezas se correlacionaba con la presencia de ácidos fenólicos liberados por las raíces de arroz. Posteriormente, otros autores (Seal et al, 2004 b), confirmaron que el mayor contenido de ácidos fenólicos en cultivares se correlacionaba con el mayor potencial alelopático. Se ha señalado, además, que los efectos diferenciales de ácidos fenólicos sobre parte aérea y raíces (estimulación del crecimiento del brote, inhibición del crecimiento de raíz de *E. cruss-galli*) podrían deberse a diferencias de sensibilidad de las mismas a estos compuestos. Aunque las concentraciones mayores a $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ requeridas para inhibir a las malezas (Dalton 1999), hacen que algunos autores desestimen el papel de los derivados fenólicos en la capacidad inhibitoria de los cultivares de arroz, Einhellig (1989) ha

demostrado que las bajas concentraciones pueden ser obviadas por efectos aditivos y/o sinérgicos entre los componentes de estas familias de compuestos, así la acción conjunta de diez aleloquímicos derivados del ácido benzoico resultó tan inhibitoria como una concentración diez veces mayor de uno de ellos.

Considerando que la actividad inhibitoria de derivados de los ácidos cinámico y benzoico es función directa de su concentración y que éstos pueden actuar en forma sinérgica, se podría pensar que la actividad alelopática de Bluebonnet 50 podría estar vinculada a la mayor producción de esos componentes. Los derivados de los ácidos benzoicos y cinámico han sido reconocidos por diferentes autores como responsables de parte de la actividad inhibitoria de diferentes especies vegetales sobre la germinación y el crecimiento de otras. Estudios realizados en la última década sobre la actividad alelopática de *Azadirachta indica* (Xuan et al., 2004), señalan a estos compuestos como principales responsables de su inhibición sobre la germinación de especies cultivadas y malezas. La actividad de estos derivados fenólicos ha sido relacionada a efectos sobre la membrana plasmática que afectan la absorción de minerales y nutrientes (Balke, 1987, Xuan, 2004). Einhellig (1995) propuso que el modo de acción de los fenólicos comienza con la perturbación de las membranas, influyendo el equilibrio energético y afectando el flujo y retención de iones. Blum (1995) sugirió que algunos ácidos fenólicos, tales como *p*-hidroxibenzoico, *p*-cumárico y ferúlico inhiben la conductividad hidráulica y la captación de nutrientes por parte de las raíces de las plantas, produciendo inhibición del crecimiento.

En el presente estudio, y en coincidencia con lo informado por diferentes autores, el ácido *p*-cumárico se asoció con uno de los cultivares alelopáticos (Bluebonnet50). En este sentido, Seal et al. (2004b) determinaron que de los derivados fenólicos encontrados en exudados radicales de arroz, el ácido *p*-cumárico era uno de los que mejor explicaba la inhibición del crecimiento de *Sagittaria montevidensis*. Por su parte, Kim et al. (2000) encontraron que la abundancia relativa de este compuesto presente aumentaba notablemente bajo radiación UV en extractos de arroces alelopáticos (Kouketsumochi, Tang Gan y Taichung Native 1). Estos resultados sugieren que el ácido *p*-cumárico es uno de los fenólicos cuya abundancia relativa puede ser regulada por el estrés ambiental.

Con respecto a los derivados diterpénicos, dada la imposibilidad de aislar estos compuestos debido a las pequeñas cantidades que se obtuvieron luego de los diferentes procesos separativos, no pudo determinarse de manera concluyente su presencia en los cultivares analizados. No obstante, los cromatogramas correspondientes a la CLAR y el análisis de los sub-extractos por espectroscopía, RMN-¹H y RMN-¹³C, sugieren la presencia de un mayor número de compuestos de este tipo en los cultivares alelopáticos. Las mayores masas relativas de sub-fracciones acetato de etilo de los extractos metanólicos de los dos cultivares alelopáticos (5,6 mg para Bluebonnet 50 y 8,1 mg para El Paso 144) frente a lo obtenido a partir de la misma masa de extracto metanólico en el caso de Supremo 13 (3,1 mg), contribuyen a aumentar la diferencia entre este último y los cultivares alelopáticos.

Estos metabolitos derivan de acetyl-CoA vía ácido mevalónico y su biosíntesis relaciona las principales fitoalexinas de arroz (Koga et al., 1995; Toyomasu et al., 2008). El efecto inhibitorio de las fitoalexinas de arroz ha sido estudiado por Nojiri et al. (1996),

Araki y Kurahashi (1999), Tamogami y Kodama (2000). Algunos autores consideran que la momilactona B es la sustancia más activa, habiéndose probado que su concentración es modulada por el estado ontogénico de la planta, alcanzando sus valores máximos antes de la floración (Kato Noguchi e Ino, 2005). Toyomaso et al. (2008) demostraron que las momilactonas A y B y los fitocasanos liberados por las raíces de arroz inhiben patógenos (tizón del arroz, podredumbre de raíz) además de afectar negativamente el crecimiento de plántulas de lechuga y repollo chino. Chung y Ahmad (2010) también relacionaron la inducción de fitocasanos con la presencia de patógenos del arroz (*Magnaporthe grisea* y *Rhizoctonia solani*) y lo han interpretado como una respuesta alelopática del arroz a plagas y otras enfermedades.

El incremento de compuestos fenólicos y terpenoides en situaciones de estrés ambiental también está bien documentado. Kato-Noguchi et al. (2007) informaron el efecto inductivo del UV sobre la acumulación de momilactona B en la rizosfera de plantas de arroz y años antes Kodama et al. (1988) estudiaron el efecto de dicha variable sobre la acumulación de fitoalexinas (momilactonas y oryzalexinas) en las hojas. Se ha informado que el aumento de radiación ultravioleta B (UV-B) induce una mayor acumulación de fenilpropanoides y flavonoides en algunas especies, tales como el poroto, el perejil, la papa, el tomate, el maíz, el centeno, la cebada y el arroz (Tevini et al., 1991 ; Liu et al. 1995; Kim et al. 2000). La radiación infrarroja es también un potente inductor de fenilpropanoides como el isovitexin que protege al arroz del estrés oxidativo (Lee et al., 2003).

En 2009, Kato-Noguchi y su equipo informaron que la capacidad alelopática del arroz sobre *E. crus-galli* se incrementa debido a la presencia de metales pesados, y del ácido jasmónico. Este último es una señal volátil de regula la biosíntesis de diferentes metabolitos secundarios, entre ellos la momilactona B.

Kong et al. (2006), determinaron que las concentraciones de momilactonas liberadas desde las plántulas de arroz al suelo se incrementan drásticamente cuando están rodeadas por *E. crus-galli*, lo cual sugeriría que las plántulas de arroces alelopáticos pueden “sentir” la presencia de algunos aleloquímicos liberados al suelo por *E. crus-galli* y responder a esto aumentando su producción de aleloquímicos.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

4. Discusión General

Posiblemente, muchos se preguntarán para qué estudiar el potencial alelopático de un cultivar. Sin embargo, sabiendo que la capacidad alelopática de las especies cultivadas se puede capitalizar para el control de malezas, reduciendo el empleo de herbicidas y fomentando una agricultura más armoniosa con el medio ambiente, la respuesta surge de manera inmediata e indubitable. De allí que el estudio de los rasgos alelopáticos de los cultivos está ocupando un lugar destacado en la literatura científica más reciente, posicionándose como una herramienta idónea para el control biológico de las malezas, con implicancias positivas sobre la estabilidad del ecosistema y la conservación de la biodiversidad.

El presente estudio se inscribe en este contexto, y tuvo como objetivo general identificar los cultivares de arroz con potencial alelopático, entre los más frecuentemente empleados en la zona arrocería argentina. Este objetivo general se bifurcó en dos objetivos específicos complementarios. Por un lado, se efectuaron bioensayos de laboratorio a efectos de seleccionar los cultivares con características alelopáticas y, por otro lado, se realizaron análisis químicos con el propósito de identificar los aleloquímicos que les confieren tales características.

Los bioensayos ejecutados permitieron identificar el efecto de seis cultivares de arroz (Cambá, El Paso 144, Bluebonnet50, IRGA 417, Supremo 13, Yeruá) sobre el desarrollo de una de sus principales malezas, la *E. crus-galli* o capín. Si se considera que los bioensayos de laboratorio se caracterizan por mantener un medio ambiente físico uniforme (luz, temperatura, agua) en todas las placas de Petri y, en ausencia de otras interferencias del crecimiento, todas las plántulas de malezas deberían haber alcanzado el mismo nivel de crecimiento. Sin embargo, este no fue el caso, ya que según fuera la variedad de arroz con la que crecían las plántulas de capín, se observó una respuesta de crecimiento completamente diferente. Por ejemplo, la longitud radical media de la maleza a los 17 días de edad fue tan sólo de 1,09 mm en presencia de un cultivar, pero alcanzó los 6,07 mm en presencia de otro cultivar.

Por lo que a partir de los resultados de los bioensayos se pudo determinar que de los seis cultivares probados, dos de ellos (El Paso 144 y Bluebonnet50) mostraron habilidad alelopática, ya que lograron inhibir el crecimiento radical del capín. Esta activa defensa química contra el capín, en consonancia con lo informado por Chang et al. (2009), sería un indicador elocuente del potencial alelopático de estos cultivares. A su vez, de estos dos cultivares, el de tipo japónica tropical (Bluebonnet50) mostró mayor actividad alelopática que el de tipo índica (El Paso 144), desde el momento que Bluebonnet50 inhibió el crecimiento del capín en un 87,50%, mientras que El Paso 144 lo hizo en un 82,70%. Estos resultados coinciden con estudios previos (Khanh et al., 2007; Lee et al., 2004), que señalan que los cultivares de tipo japónica tropical tienen mayor capacidad de supresión del capín que los de tipo indica o los híbridos. En tanto que los porcentajes de inhibición registrados están en sintonía con los informados por estudios anteriores (Dilday et al., 1998; Hassan et al., 1998; Olofsdotter et al., 1999) en los que se ha trabajado con arroces de una gran diversidad de orígenes y de una amplia gama de tipos (por ejemplo, tradicionales, modernos, de porte alto, enanos, etc.).

Vale decir que, en línea con numerosos especialistas (Chang et al., 2009; Pheng et al., 2009) quienes en estos últimos 15-20 años vienen informando acerca del potencial alelopático de las más diversas líneas de arroz cultivadas alrededor del mundo, del presente estudio surge que algunos de los cultivares empleados en la Mesopotamia argentina también poseen características alelopáticas. De manera que si se analizan los resultados del presente estudio a la luz de los criterios enumerados por Blum et al. (1999) para establecer la capacidad alelopática de un cultivo, entonces se puede indicar que tanto el cultivar BlueBonnet50 como El Paso 144 deben contener/producir y liberar alguna sustancia química capaz de inhibir el crecimiento del sistema radical del capín (primer criterio); la concentración de tal sustancia debe ser suficiente como para inhibir la captación de agua y/o nutrientes a través de las raíces del capín (segundo criterio) y, los parámetros de inhibición observados no pueden ser explicados por otros factores físicos o bióticos (tercer criterio), ya que las condiciones de crecimiento han sido idénticas para los grupos experimentales y el testigo.

Posteriormente, estos dos cultivares que demostraron poseer una mayor capacidad alelopática, así como el que no mostró ningún potencial en este sentido (Supremo 13) fueron cultivados para análisis de identificación de los compuestos aleloquímicos. El cultivo se realizó en invernáculo, en macetas con tierra y perlita, mediante una modificación propia de la técnica de Aislamiento Guiado desarrollada por Rimando et al. (2001). La modificación introducida (mejor control de la disponibilidad de agua y uniformidad de las condiciones medio ambientales para el crecimiento de las plántulas), transformaron al bioensayo en un test más reproducible, tal como lo ha señalado Pheng et al. (2009) para referirse a ajustes similares efectuados en bioensayos empleados por su propio equipo de investigación.

En esta segunda fase del estudio se efectuaron análisis cromatográficos y espectroscópicos con el propósito de comparar los perfiles metabólicos de los cultivares con propiedades alelopáticas contrastantes. Tales análisis se efectuaron en los tejidos radicales, habida cuenta que diferentes especialistas (Lee et al., 2008; Seal & Pratley, 2010), coinciden en señalar que, para los estudios alelopáticos de cultivares de arroz, son biológicamente más significativas las determinaciones en los tejidos radicales que en otros tejidos de la planta. Si bien estas determinaciones son más difíciles de realizar porque en las raíces los compuestos se encuentran en cantidades muy pequeñas y dentro de matrices complejas, en la actualidad su ejecución se ve facilitada mediante la aplicación de técnicas de gran sensibilidad, tales como las que se usaron en este estudio.

El empleo de la cromatografía gaseosa permitió analizar los perfiles cromatográficos de los extractos no polares de los tres cultivares. En este sentido, los cultivares alelopáticos presentaron mayor proporción de derivados oxigenados que el cultivar no alelopático. Asimismo, se pudo determinar que el hexadecanoato de metilo fue el compuesto mayoritario en el cultivar Bluebonnet50, en tanto que el ácido hexadecanoico fue el más abundante en El Paso 144. Estos compuestos no polares serían responsables de conferirle a los cultivares propiedades antimicrobianas y la capacidad de regular el establecimiento de las plántulas (Ens et al., 2009).

Por medio de la cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa se efectuó el análisis de los metabolitos secundarios polares, el que reveló la presencia de fitocanos y momilactonas en los extractos metanólicos de raíz de los tres cultivares de arroz. A bajos tiempos de retención, para los tres cultivares, se detectó la presencia de derivados fenólicos (en coincidencia con lo informado por Chang et al., 2009; Rimando et al., 2001; Seal et al., 2004a, b); y un mayor peso relativo de los ácidos cafeíco, vanílico, *p*-cumárico y ferúlico y del glucósido de quercetina. Los compuestos fenólicos son reconocidos antimicrobianos y reguladores del crecimiento (Hattenschwiler & Vitousek, 2000; Souto et al. 2000). A tiempos de retención algo superiores se obtuvieron las mayores diferencias entre los tres extractos. En este sentido, sólo los cultivares alelopáticos mostraron la presencia de derivados esteroidales y diterpenoidales, lo que es consistente con estudios previos (Bi et al., 2007; Xiong et al., 2007; Song et al., 2008).

Finalmente, y dada la similitud de sus perfiles cromatográficos, ambos cultivares alelopáticos se unificaron y fraccionaron por cromatografía en columna de partición por geles. El análisis de las fracciones por sílica gel y por espectroscopía de resonancia magnética nuclear permitió determinar la presencia de un glucósido de β -sitosterol y las momilactonas A y B. La identificación de momilactonas A y B está en sintonía con los hallazgos informados por Agrawal et al. (2002), para quienes las momilactonas desempeñan funciones de fitoalexinas; así como con los presentados por Kong et al. (2006), quienes observaron que los arrozales alelopáticos liberaban momilactona B a niveles tóxicos y aumentaban la cantidad de aleloquímicos cuando estaban rodeados de *E. crus-galli*. En base a tales observaciones, argumentaron que las plántulas de arroz alelopático podían detectar la presencia del capín y responder aumentando su producción de aleloquímicos para inhibirlo. Por su parte, Kato-Noguchi ha señalado en diversas oportunidades (Kato-Noguchi, 2004, 2011; Kato-Noguchi et al., 2010) que la momilactona B es la principal responsable del efecto inhibitorio de las plántulas de arroz. Este autor también ha indicado (Kato-Noguchi, 2011) que como la actividad alelopática y la concentración de momilactona B en las plántulas de arroz, aumentan en presencia de las plántulas de capín, probablemente, esos incrementos se deban no sólo a la competencia por nutrientes entre las dos especies, sino también por los compuestos químicos exudados por las raíces del capín. Como la momilactona B posee una fuerte actividad fitotóxica y alelopática (Kato-Noguchi et al., 2008; 2010), su elevada producción y secreción por parte del arroz puede proporcionar una ventaja competitiva para el establecimiento de la raíz del cultivo a través de la supresión local de patógenos y la inhibición del crecimiento de plantas de especies competitivas, incluyendo el capín.

Esta diafonía química (como la acaba de rotular Kato Noguchi (2011) para referirse a este “cruce de palabras” entre la planta donante y la objetivo), es un proceso esencial para el desarrollo de las conexiones físicas en toda relación parásita o simbiótica (Bais et al., 2006). A pesar que el capín es una de las malezas más comunes y nocivas del arroz, todavía no se conoce la razón por la que invade los arrozales. Para Kato-Noguchi (2011) puede deberse a algunas interacciones especiales entre ambas plantas, por lo que sugiere que el arroz puede ser “consciente” de la presencia de capines vecinos mediante la detección de ciertas claves en los exudados de raíz del capín. Por lo que esta función sensorial podría desencadenar una cascada de señales que se traducirían en el aumento de la producción de momilactona B. Frente a este escenario, concluye señalando (y compartimos sus

expresiones) que la alelopatía del arroz podría ser un mecanismo de defensa inducido por las interacciones químicas entre el arroz y el capín.

Como toda investigación empírica, la presente se caracteriza por algunas fortalezas y debilidades. Entre las debilidades, se puede señalar el hecho de haber realizado bioensayos de laboratorio y no haber planificado la ejecución de un ensayo en invernadero o a campo. Si bien es cierto que, por lo general, el potencial alelopático se determina a través de bioensayos de laboratorio, analizando los efectos de los exudados liberados por una planta donante sobre la germinación de otra planta (objetivo), este tipo de bioensayos suelen ser criticados porque no lograría predecir exactamente lo que sucede en una situación a campo. Algunas críticas (Gibson, 2002), focalizan en las dificultades de los bioensayos de laboratorio para reproducir las interacciones alelopáticas que ocurren a campo, sobre todo las vinculadas con la concentración, liberación y degradación de los agentes alelopáticos. En este sentido, se ha señalado (Pisula & Meiners, 2010; Teerarak et al., 2010), que es probable que los aleloquímicos en el suelo sean liberados a un ritmo diferente y puedan perderse en la tierra por degradación, lixiviación, o unión con otros compuestos químicos. También se ha subrayado que la actividad fitotóxica de los aleloquímicos se relaciona, básicamente, con la descomposición a cargo de los microorganismos del suelo (Kobayashi et al., 2008). Sin embargo, a pesar de tales críticas, son numerosos los especialistas (Pheng et al., 2009; Pisula & Meiners, 2010) que remarcan que los bioensayos de laboratorio son muy útiles para la detección del potencial alelopático de especies que, a posteriori, pueden ser sometidas a estudios de campo más detallados. A su vez, cada día son más las evidencias empíricas (Pisula & Meiners, 2010) que muestran que el potencial alelopático previamente encontrado en bioensayos de laboratorio se confirma en experimentos a campo. Al respecto, en su reciente estudio con 359 cultivares camboyanos de arroz, Pheng et al. (2009) señalan que "...fue particularmente alentador encontrar que el bioensayo posterior, llevado a cabo en macetas, con tierra común, arrojó resultados similares a los obtenidos en los bioensayos de laboratorio. Las líneas de arroz que mostraron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las malezas en el laboratorio fueron también las líneas que mostraron el mismo efecto en el suelo" (pp. 264). Otra de las debilidades del trabajo estaría vinculada con la elección de los cultivares en estudio, los que si bien fueron indicados como los más utilizados en la zona mesopotámica tanto por semilleros como por productores al inicio del proceso de investigación (2007), en la actualidad pueden haber perdido sus posiciones relativas. Por lo que en futuros estudios, podrían analizarse otros cultivares de arroz recientemente introducidos o que gocen de las preferencias más actualizadas de los productores. Finalmente, una tercera limitación podría estar vinculada con el tiempo que demandaron los análisis químicos, los que por diversos motivos se fueron dilatando en el tiempo.

Entre las fortalezas, hay que destacar que el presente trabajo constituye el primer antecedente del análisis de las potencialidades alelopáticas de variedades de arroz de uso frecuente en Argentina. Con lo que queda inaugurada una línea de investigación promisoriosa, habida cuenta que el estudio de las características alelopáticas del arroz está capturando la atención de científicos de la mayoría de las regiones productoras del mundo. Sin embargo, posiblemente, la mayor fortaleza de la presente investigación esté referida a la identificación de algunos de los componentes responsables de la alelopatía de un par de cultivares usados en el país. Esta información podría, por ejemplo, ser empleada para el

desarrollo y/o mejoramiento de cultivares resistentes al capín, lo que facilitaría el control de malezas y reduciría el empleo de herbicidas sintéticos.

Por la complejidad del fenómeno, demostrar experimentalmente la capacidad alelopática de un cultivar podría considerarse, simplemente, como la enunciación del problema. Ya que la nueva agenda para futuras investigaciones incluiría, entre otras acciones, la identificación de los mecanismos de liberación de las sustancias aleloquímicas, su concentración y residualidad en el medio ambiente, así como la ejecución de estudios que permitan responder a interrogantes tales como ¿la actividad alelopática de los cultivares BlueBonnet50 y El Paso 144 se localiza sólo en la raíz o está presente también en otras partes de la planta?, ¿cuáles son los mecanismos autoprotectores que impiden que la planta donante se autointoxique con los aleloquímicos producidos?, ¿cuánto tiempo permanecen los aleloquímicos en el suelo una vez que son liberados?. Las respuestas a estas y otras tantas preguntas sólo se lograrán a través de un programa sistemático y sostenido de ensayos de laboratorio e investigaciones a campo. Por lo que, a modo de síntesis se podría decir que el presente estudio deberá ser complementado con sucesivos bioensayos con otros cultivares de arroz empleados en el medio, otras malezas que compartan el rango de agresividad del capín, identificaciones de los aleloquímicos del arroz que impacten negativamente sobre las futuras malezas a probar, así como el aislamiento de tales sustancias fitotóxicas y posterior mejoramiento de cultivares mediante el agregado de los caracteres alelopáticos aislados.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

5. Conclusiones

El presente trabajo ha permitido identificar dos cultivares de arroz con potencial alelopático, e individualizar algunos de los aleloquímicos que le confieren tales características. Se trata de dos cultivares (BlueBonnet 50 y El Paso 144) de uso frecuente en la zona arroceras argentina, concentrada en las provincias de Santa Fe, Entre Ríos y Corrientes. En términos pragmáticos, la identificación de los compuestos inhibitorios y una mayor comprensión de su capacidad alelotóxica, podrían sentar las bases para la aplicación de técnicas de ingeniería genética para aumentar la producción de estos aleloquímicos. El objetivo final sería la producción de cultivares de arroz altamente alelopáticos, caracterizados por poseer sus propios mecanismos de defensa contra las malezas (plagas y enfermedades) asociadas.

En sistemas de economías de subsistencia (como lo son las pequeñas chacras arroceras del litoral argentino), el desarrollo de una estrategia que incluya un cultivar con "la capacidad incorporada de suprimir malezas" podría tener ventajas importantes sobre los enfoques convencionales que se basan en el desmalezado manual o el empleo de herbicidas costosos. Sobre todo porque el empleo de un cultivar con actividad alelopática no requiere la adopción de ninguna tecnología agrícola complicada y reduciría (o eliminaría) la aplicación de herbicidas. Se trata de ventajas que contribuirían a mantener bajos los costos de producción y evitarían la contaminación del medio ambiente, sin afectar a otras actividades complementarias, tales como la apicultura y la fruticultura.

El desarrollo de cultivares de arroz alelopáticos abre un futuro prometedor, aunque hasta el momento no existen cultivares comerciales con tales características. Para que ese futuro se convierta en una realidad tangible, todavía deben investigarse a fondo otros problemas potenciales, tales como la autotoxicidad, el desequilibrio metabólico, los efectos residuales y el desarrollo de una población tolerante a siembras sucesivas de estos nuevos cultivares. Problemáticas que requieren ser abordadas por equipos multidisciplinarios, en los que agrónomos, ecólogos, químicos, fitomejoradores y biólogos moleculares pueden aportar sus conocimientos. Hasta el momento se ha dado un gran paso, ya que si bien la alelopatía por sí sola no puede combatir por completo a las malezas, existe consenso entre los especialistas (Bertholdsson, 2010; Chang et al, 2009; Ens et al., 2009; Kato-Noguchi, 2011; Pheng et al, 2009) que puede funcionar como un componente importante en el manejo integrado de malezas.

CAPITULO V

BIBLIOGRAFÍA

6. Bibliografía citada

- Acevedo MA, Castrillo WA, Belmonte UC (2006) Rice origin, evolution and diversity. *Agronomía tropical* **56**, 151-170.
- Agrawal GK, Rakwal R, Tamogami S, Yonekura M, Kubo A, Saji H (2002) Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. *Plant Physiology Biochemistry* **40**, 1061–1069.
- Ahn J K, Chung IM (2000) Allelopathic potential of rice hulls on germination and seedling growth of barnyardgrass. *Agronomy Journal* **92**, 1162–1167.
- Araki Y, Kurahashi Y (1999) Enhancement of phytoalexin synthesis during rice blast infection of leaves by pre-treatment with carpopamid. *Journal of Pesticide Science* **24**, 369–374.
- Asociación Correntina de Plantadores de Arroz (2010) `Memoria descriptiva relevamiento arrocero nacional. 1er informe campaña 2010/11: Fin de siembra´. (ACPA: Corrientes)
- Bais H P, Vepachedu R, Gilroy S, Callaway RM, Vivanco JM (2003) Allelopathy and exotic plant invasion: From molecules and genes to species interactions. *Science* **301**, 1377–1380.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 233–66.
- Balke NE, Davis MP, Lee CC (1987) Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry. (Ed. GR Waller) pp. 214-227. (American Chemical Society: Washington, D.C.)
- Barrett SCH, Wilson BF (1981) Colonizing ability in the *Echinochloa crus-galli* complex (barnyardgrass) I. Variation in life history. *Canadian Journal of Botany* **59**, 1844-1860.
- Barrett SCH, Wilson BF (1983) Colonizing ability in the *Echinochloa crus-galli* complex (barnyardgrass) II. Seed biology. *Canadian Journal of Botany* **61**, 556-562.
- Bertholdsson NO (2010) Breeding spring wheat for improved allelopathic potential. *Weed Research* **50**, 49–57.
- Bi HH, Zeng RZ, Su LM, AnM, Luo SH (2007) Rice allelopathy induced by methyl jasmonate and methyl salicylate. *Journal Chemical Ecology* **33**, 1089–103.
- Blum U (1995) The value of model plant-microbe-soil systems for understanding processes associated with allelopathic interactions: One example. In ‘Allelopathy: organisms,

- processes, and applications` (Eds KMM Dakshini, FA Einhellig) pp. 127-131. (American Chemical Society: Washington D.C)
- Blum U, Shafer SR, Lehmen ME (1999) Evidence for inhibitory interactions involving phenolic acids in field soils: concepts vs. experimental model. *Critical Reviews in Plant Sciences* **18**, 673-693.
- Bolsa de Cereales de Entre Ríos (2010) `Estimaciones de siembra 2010`. www.bolsacer.com.ar. Fecha de acceso: marzo de 2011.
- Bouchade M, Bayer D.E. (1993) Photosynthetic response of flooded rice (*Oryza sativa*) and three Echinochloa species to changes in environmental factors. *Weed Science* **41**, 611-614.
- Bouillant ML, Jacoud C, Zanella I, Favre-Bonvin J, Bally R (1994) Identification of 5-(12-heptadecenyl)-resorcinol in rice root exudates. *Phytochemistry* **35**, 769-771.
- Brondani C, Rangel PHN, Brondani RPV, Ferreira ME (2002) QTL mapping and introgression of yield-related traits from *Oryza glumaepatula* to cultivated rice (*Oryza sativa*) using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* **104**, 1192-1203.
- Buso GSC, Rangel PH, Ferreira ME (2001) Analysis of random and specific sequences of nuclear and cytoplasmic DNA in diploid and tetraploid American wild rice species (*Oryza spp.*). *Genome* **44**, 476-494.
- Butsat N, Weerapreeyakul N, Siriamornpun S (2009) Changes in phenolic acids and antioxidant activity in Thai rice husk at five growth stages during grain development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 4566-4571.
- Cabezas Bolaños E, Espinoza Esquivel A (2000) El arroz en América: Su introducción y primeras siembras. *Revista de Historia de América* **126**, 7-18.
- Canals M (2008). Historia de la resonancia magnética de Fourier a Lauterbur y Mansfield: en ciencias, nadie sabe para quién trabaja. *Revista Chilena de Radiología* **14**, 39-45.
- Carñel GE (2008) Censo productivo arrocero 2007-2008 Entre Ríos. Resultados experimentales 2007-2008. *Proarroz* **16**, 9-14.
- Chang XF, Jun X, Long Q, Hai-Bin W, Bi-Qing S, Hai-Bin H, Rui-Yu L, Wen-Xiong L (2009) Analysis of gene expressions associated with increased allelopathy in rice (*Oryza sativa* L.) induced by exogenous salicylic acid. *Plant Growth Regulation* **57**, 163-172.
- Chen LJ, Lee DS, Song ZP, Suh HS, Lu BR (2004) Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relative s. *Annals of Botany* **93**, 67-73.

- Chon SU, Kim YM (2004) Herbicidal potential and quantification of suspected allelochemicals from four grass crop extracts. *Journal of Agronomy and Crop Science* **190**, 45-150.
- Chou CH, Chang FJ, Oka HS (1991) Allelopathic potential of wild rice, *Oryza perennis*. *Taiwania* **36**, 201–210.
- Chou CH, Chiou SJ (1979) Autointoxication mechanism of *Oryza sativa* L. II. Effect of culture treatments on the chemical nature of paddy soil and on soil productivity. *Journal of Chemical Ecology* **5**, 839–859.
- Chou CH, Lin HJ (1976) Autointoxication mechanism of *Oryza sativa* L. I. Phytotoxic effects of decomposing rice residues in soil. *Journal of Chemical Ecology* **2**, 353–367.
- Chung IM, Ahmad A (2010) Herbicidal activities of allelopathic and other compounds from *Oryza sativa*. *Allelopathy Journal* **26**, 139-156.
- Chung IM, Ahn JH, Yun SJ (2001) Identification of allelopathic compounds from rice (*Oryza sativa* L.) straw and their biological activity. *Canadian Journal Plant Scientific* **81**, 815-819.
- Chung IM, Ali M, Ahmad A, Lim JD, Yu CY, Kim JS (2006) Chemical constituents of rice (*Oryza sativa*) hulls and their herbicidal activity against duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm). *Phytochemical Analysis* **17**, 36–45.
- Chung IM, Hahn S, Ahmad A (2005) Confirmation of potential herbicidal agents in Hulls of rice: *Oryza sativa* L. *Journal of Chemicals Ecology* **31**, 1339-1352.
- Chung IM, Kim KH, Ann JK, Lee, SB, Kim SH, Hahn SJ (2003) Allelopathic comparison of allelopathic potential of rice leaves, straw and hull extracts on Barnyardgrass. *Agronomical Journal* **95**, 1063-1070.
- Cudlin JM, Blumauerova N, Steinerova N, Mateju J, Zalabak V (1976) Biological activity of hydroxyanthraquinones and their glycosides toward microorganism. *Folia Microbiology* **21**, 54-57.
- Dalrymple DG (1986) 'Development and spread of high-yielding wheat varieties in developing countries'. (Bureau for Science and Technology, Agency for International Development: Washington, DC)
- Dalton BR (1999) The occurrence and behavior of plant phenolic acids in soli environments and their potential involvement in allelochemical interference interactions: Methodological limitations in establishing conclusive proof of allelopathy. In 'Principals and Practices in Plant Ecology: Allelochemical Interactions' (Eds. Inderjit, KMM Dakshini, CL Foy) pp. 57-74 (CRC Press: Boca Raton, FL)

- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2010) `InfoStat versión 2010`. (Grupo InfoStat, FCA, UNC: Córdoba)
- Dilday RH, Yan WG, Moldenhauer KAK, Gravois KA (1998) Allelopathic activity in rice for controlling major aquatic weeds. In: `Allelopathy in Rice` (Ed. M Olofsdotter) pp. 7-26. (International Rice Research Institute: Manila, The Philippines)
- Dimitri MJ (1987) `Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería`. (Acme SACT: Buenos Aires).
- Durant AA, Fente CA, Franco CM, Vazquez BI, Cepeda A (2002) Gas chromatography-tandem mass spectrometry determination of 17 *a*-ethinylestradiol residue in the hair of cattle, application to treated animals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 436–440.
- Ebana K, Yan W, Dilday RH, Namai H, Okuno K (2001) Variation in the allelopathic effect of rice with water soluble extracts. *Agronomy Journal* **93**, 12-16.
- Einhellig FA (1989) Interactive Effects of Allelochemicals and Environmental Stress. In `Phytochemical Ecology: Alelochemicals, Mycotoxins, and Insect Pheromones and Allomones` (Eds CH Chou, GR Waller) pp. 101-116 (Academia Sinica Monograph Series 9: Taipei)
- Einhellig FA (1995) Allelopathy: current status and future goals. In `Allelopathy: Organisms, Processes, and Applications` (Eds Inderjit, KMM Dakshini, FA Einhellig) pp. 1-24. (American Chemical Society: Washington, DC)
- Einhellig FA, Leather GR, Hobbs L (1985) Use of *Lemna minor* L. as a bioassay in allelopathy. *Journal of Chemical Ecology* **11**, 65-72.
- Ens EJ, French K, Bremmer JB (2009) Evidence for allelopathy as a mechanism of community composition change by an invasive exotic shrub, *Chrysanthemoides monilifera* spp. *Rotundata*. *Plant Soil* **316**, 125–137.
- Estorninos LE, Gbur EE, Talbert RE, Gealy DR (2005a) Rice and red rice interference. I. Response of red rice (*Oryza sativa*) to sowing rates of tropical japonica and indica rice cultivars. *Weed Science* **53**, 676-682.
- Estorninos LE, Talbert RE, McClelland MR, Gealy DR, Gbur, EE (2005b) Rice and red rice interference. II. Rice response to population densities of three red rice (*Oryza sativa*) ecotypes. *Weed Science* **53**, 683-689.
- Farago S, Brunold C, Kreuz K (1994) Herbicide safeners and glutathione metabolism. *Physiologia Plantarum* **91**, 537-542.
- Fay PK, Duke WB (1977) An assessment of allelopathic potential in *Avena* germoplasm. *Weed Science* **25**, 224-228.

- Ferrer Roser C (2004) Desarrollo de técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para el análisis geoquímico, paleoclimático y ambiental. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, Universidad de Barcelona, España.
- Fujii Y (1992) The allelopathic effect of some rice varieties. Proceedings of the International Symposium on Biological Control Integrated Management of Paddy and Aquatic Weeds in Asia. National Agricultural Research Center, Tsukuba, Japan. pp. 1–6.
- Fujii Y (1995) The use of allelopathic chemicals in sustainable agriculture. Proceedings of the National Conference of Plant Growth Regulators Society. Minneapolis, EEUU. pp. 14-18.
- Fujii Y, Shibuya T (1992) Establishment of a new bioassay specific to allelopathy. Survey of allelopathic plant by the Plant Box Method. *Weed Research* **36**, 152–153.
- Ge S, Sang T, Lu B, Hong D (1999) Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. *Proceedings of the National Academy of Science* **96**, 14400-14405.
- Gealy DR, Moldenhauer KA (2005). Progress in developing weed suppressive rice cultivars for the southern U.S. In 'Handbook of Sustainable Weed Management'. (Eds. H Singh, D Batish, R Kohli) pp. 257-296 (Haworth Press: Binghamton, NY)
- Gealy DR, Tai TH, Sneller CH (2002) Identification of red rice, rice, and hybrid populations using microsatellite markers. *Weed Science* **50**, 333-339.
- Gealy DR, Wailes EJ, Estorninos LE Jr, Chavez RSC (2003) Rice cultivar differences in suppression of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) and economics of reduced propanil rates. *Weed Science* **51**, 601-609.
- Giarrocco LE, Marassi MA, Salerno GL (2007) Assessment of the genetic diversity in Argentine rice cultivars with SSR markers. *Crop Science* **47**, 853-860.
- Gibson DJ (2002) 'Methods in Comparative Plant Population Ecology'. (Oxford University Press: New York, NY)
- Gibson KD, Fischer AJ, Foin TC, Hill JE (2002) Implications of delayed *Echinochloa sp.* germination and duration of competition for integrated weed management in water-seeded rice. *Weed Research* **42**, 351-360.
- Gramene (2011) *Oryza*. Documento en línea. Disponible en: http://www.gramene.org/species/oryza/rice_taxonomy.html Fecha de consulta: Octubre de 2010.
- Haig T (2001) Application of hyphenated chromatography–mass spectrometry techniques to plant allelopathy research. *Journal of Chemical Ecology* **27**, 2363-2396.

- Harper JL (1961) Approaches to the study of plant competition. In 'Mechanisms in Biological Competition' (Eds: FL Milthorp) pp. 1–39. (Cambridge University Press: London)
- Harper JL (1964) The nature and consequence of interference among plants. Proceedings of the 11th International Conference of Genetics. The Hague, Randstad. pp.465-481.
- Hassan SM, Aidy IR, Bastawisi AO, Draz AE (1998) Weed management using allelopathic rice in Egypt. In: 'Allelopathy in Rice' (Ed. M Olofsdotter) pp. 27-37. (International Rice Research Institute: Manila, The Philippines).
- Hattenschwiler S, Vitousek PM (2000) The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends Ecology and Evolution* **15**, 238–243
- Hatzios KK, Burgos N (2004) Metabolism-based herbicide resistance: regulation by safeners. *Weed science* **52**, 454-467.
- He HB, Lin WX, Wang HB, Fang CX, Gan QK, Wu WX, Chen XX, Liang YY (2006) Analysis of metabolites in root exudates from allelopathic and non allelopathic rice seedlings. *Allelopathy Journal* **18**, 247-254
- He HY, Koike M, Ishimaru T, Ohsugi R, Yamagishi T (2005) Temporal and spatial variations of carbohydrate content in rice leaf sheath and their varietal difference. *Plant Production Science* **8**, 546-552.
- Heftman E (1975) Functions of steroids in plants. *Phytochemistry* **14**, 891-901.
- Hoagland R, Williams R (2004) Bioassay – useful tools for the study of allelopathy. In 'Allelopathy-Chemistry and mode of action of allelochemicals'. (Eds. FA Macías, JCG Galindo, JMG Molinillo, HG Cutler) pp. 315-351. (CRC Press: Boca Raton, FL)
- Hong NH, Xuan TD, Tsuzuki E, Terao H, Matsuo M, Khanh TD (2004). Weed control of four higher plant species in paddy rice fields in Southeast Asia. *Journal of Agronomy and Crop Science* **190**, 59-64.
- Inderjit (2006) Experimental complexities in evaluating the allelopathic activities in laboratory bioassays: a case study. *Soil Biology & Biochemistry* **38**, 256-262.
- Inderjit, del Moral R (1997) Is separating resource competition from allelopathy realistic? *Botanical Review* **63**, 221-230.
- Inderjit, Duke SO (2003) Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta* **217**, 529-539.
- Inderjit, Streibig JC, Olofsdotter M (2002) Joint action of phenolic acid mixtures and its significance in allelopathy research. *Physiologia Plantarum* **114**, 422-428.

- Jennings J, Nelson CJ (2002) Zone of autotoxic influence around established alfalfa plants. *Agronomy Journal* **94**, 1104–1111.
- Jensen LB, Courtois B, Shen L, Li Z, Olofsdotter M, Mauleon RP (2001) Location genes controlling rice allelopathic effects against barnyardgrass in upland rice. *Agronomy Journal* **93**, 21-26.
- Jung IM, Kim JT, Kim SH (2006) Evaluation of allelopathic potential and quantification of momilactone A, B from rice hull extracts and assessment of inhibitory bioactivity on paddy field weeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 2527-2536.
- Karim RSM, Man AB, Sahid IB (2004). Weed problems and their management in rice fields of Malaysia: An overview. *Weed Biology and Management* **4**, 177–186.
- Kato T, Kabuto C, Sasaki N, Tsunagawa M, Aizawa H, Fujita K, Kato Y, Kitahara Y (1973) Momilactones are growth inhibitors from rice (*Oryza sativa* L.). *Tetrahedron Letters* **39**, 3861–3864.
- Kato-Noguchi H (2004) Allelopathic substance in rice root exudates: rediscovery of momilactone B as an allelochemical. *Journal of Plant Physiology* **161**, 271–6.
- Kato-Noguchi H (2011) Barnyard grass-induced rice allelopathy and momilactone B. *Journal of Plant Physiology* **168**, 1016–1020.
- Kato-Noguchi H, Hasegawa M, Ino T, Ota K, Kujime H (2010) Contribution of momilactone A and B to rice allelopathy. *Journal of Plant Physiology* **167**, 787–91.
- Kato-Noguchi H, Ino T (2003) Rice seedlings release momilactone B into the environment. *Phytochemistry* **63**, 551–554.
- Kato-Noguchi H, Ino T (2005) Possible involvement of momilactone B in rice allelopathy. *Journal of Plant Physiology* **162**, 718–721.
- Kato-Noguchi H, Kujime H, Ino T (2007) UV-induced momilactone B accumulation in rice rhizosphere. *Journal of Plant Physiology* **164**, 1548-1551
- Kato-Noguchi H, Ota K, Ino T (2008) Release of momilactone A and B from rice plants into the rhizosphere and its bioactivities. *Allelopathy Journal* **22**, 321–8.
- Kato-Noguchi H, Salam MA, Kobayashi T (2009) A quick seeding test for allelopathic potential of Bangladesh rice cultivars. *Plant Production Science* **12**, 47-49.
- Kawaguchi S, Yoneyama K, Yokota T, Takeuchi Y, Ogasawara M, Konnai M (1997) Effects of aqueous extract of rice plants (*Oryza sativa* L.) on seed germination and radicle elongation of *Monochoria vaginalis* var. *plantaginea*. *Plant Growth Regulation* **23**, 183–189.

- Kaworu E (2001) Variation in allelopathic effect of rice with water soluble extracts. *Agronomy Journal* **93**, 12–16
- Khanh TD, Xuan TD, Chung IM (2007) Rice allelopathy and the possibility for weed management. *Annals of Applied Biology* **151**, 325–339.
- Khush GS (1997) Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Molecular Biology* **35**, 25–34.
- Kim KU, Shin DH (1998). Rice allelopathy research in Korea. In: `Allelopathy in Rice´ (Ed. M Olofsdotter) pp. 39–43. (International Rice Research Institute: Manila, The Philippines).
- Kim KU, Shin DH, Lee IJ, Kim HY (2000) Rice allelopathy in Korea. Proceedings of International Workshop in Rice Allelopathy. Institute of Agricultural Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu, Korea. pp. 57–82.
- Kim SY, Madrid AV, Park ST, Yang SJ, Olofsdotter M (2005) Evaluation of rice allelopathy in hydroponics. *Weed Research* **45**, 74–79.
- Kim SY, Park H, Park E, Lee S (2007) Cytotoxic and Antitumor Activity of Momilactone B from Rice Hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 1702–1706.
- Kim WK, Kim KU (2000) Searching for rice allelochemicals. Proceedings of International Workshop in Rice Allelopathy. Institute of Agricultural Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu, Korea. pp. 15–26.
- Kobayashi K, Itaya D, Mahatamnuchoke P, Pornprom T (2008) Allelopathic potential of itchgrass (*Rottboellia exaltata* L.f.) powder incorporated into soil. *Weed Biology and Management* **8**, 64–68.
- Kodama O, Suzuki T, Miyakawa J, Akatsuka T (1988) Ultraviolet-induced accumulation of phytoalexins in rice leaves. *Agricultural Biological Chemistry* **52**, 2469–2473.
- Koga J, Shimura M, Oshima K, Ogawa N, Yamauchi T, Ogasawara N (1995) Phytocassanes A, B, C and D, novel diterpene phytoalexins from rice, *Oryza sativa* L. *Tetrahedron* **51**, 7907–7918.
- Kong C, Liang W, Xu X, Hu F, Wang P, Jiang Y (2004) Release and Activity of Allelochemicals from Allelopathic Rice Seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 2861–2865.
- Kong CH, Li HB, Hu F, Xu XH, Wang P (2006) Allelochemicals released by rice roots and residues in soil. *Plant Soil* **288**, 47–56.
- Kudsk P, Streibig JC (2003) Herbicides – a two-edged sword. *Weed Research* **43**, 90–102.

- Kuwatsuka S, Shindo H (1973) Behavior of phenolic substances in the decaying process of plants. I. Identification and quantitative determination of phenolic acids in rice straw and its decayed product by gas chromatography. *Soil Science and Plant Nutrition* **19**, 219–227.
- Kwon SL, Smith RJ Jr, Talbert RE (1992) Interference durations of red rice (*Oryza sativa*) in rice (*O. sativa*). *Weed Science* **39**, 363-368.
- Leather GR, Einhellig FA (1986) Bioassays in the study of allelopathy. In 'The science of allelopathy'. (Eds AR Putnam, CS Tang) pp. 133-145 (John Wiley & Sons: New York)
- Lee HW, Ghimire SR, Shin DH, Lee IJ, Kim KU (2008) Allelopathic effect of the root exudates of K21, a potent allelopathic rice. *Weed Biology and Management* **8**, 85-90.
- Lee SB, Kim J, Jeong S, Kim D, Ha J, Nam K, Ahn D (2003) Effect of far-infrared radiation on the antioxidant activity of rice hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4400-4403
- Lee SB, Ku YC, Kim KH, Hahn SJ, Chung IM (2004) Allelopathic potential of rice germplasm against barnyardgrass. *Allelopathy Journal* **13**, 17–28.
- Leicach, SR (2006) 'Alelopatía. Interacciones químicas en la comunicación y defensa de plantas'. (EUDEBA: Buenos Aires)
- Liu DL, An M, Jhonson IR, Lovett JV (2005) Mathematical modeling of allelopathy: IV. Assessment of Contributions of Competition and Allelopathy to Interference by Barley. *Nonlinearity in Biology, Toxicology, Medicine* **3**, 213–224.
- Liu DL, Lovett JV (1993) Biologically active secondary metabolites of barley. I. Developing techniques and assessing allelopathy in barley. *Journal of Chemical Ecology* **19**, 2217–2230.
- Liu L, Gitz DC, McClure MW (1995) Effect of UV-B on flavonoids, ferulic acid, growth and photosynthesis in barley primary leaves. *Physiology Plant* **93**, 725-733.
- Mariam AL, Zakri AH, Mahani MC (1996) Interspecific hybridization of cultivated rice, *Oryza sativa* L. with the wild rice, *O. minuta* Presl. *Theoretical and applied genetics* **93**, 664-671.
- Matsunaka, S (2001) Historical review of rice herbicides in Japan. *Weed Biology and Management* **1**, 10-14.
- Matsuyama N (1983) On the detection of momilactone A and B in healthy and blast-infected rice leaves by GLC. *Annals of the Phytopathology Society Japan* **49**, 200-205.

- Mattice JD, Dilday RH, Gbur EE, Skulman BW (2001) Barnyardgrass growth inhibition with rice using high-performance liquid chromatography to identify rice accession activity. *Agronomy Journal* **93**, 8-11.
- Mattice JD, Lavy T, Skulma BW, Dilday RH (1998) Searching for allelochemicals in rice that control duckweed. In: `Allelopathy in Rice´ (Ed. M Olofsdotter) pp. 81-98. (International Rice Research Institute: Manila, The Philippines).
- McDonald DJ (1994) Temperate rice technology for the 21st century: an Australian example. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **34**, 877-888.
- Multani DS, Khush G, de los Reyes BG (2003) Alien genes introgression and development of monosomic alien addition lines from *O. latifolia* Desv. to rice, *Oryza sativa*. *Theoretical and applied genetics* **107**, 395-405.
- Muller C (1969) Allelopathy as a factor in ecological process. *Vegetatio* **18**, 348-357.
- Navarez D, Olofsdotter M (1996) Relay seeding procedure as screening method in allelopathy research. Proceedings of the 2nd International Weed Control Conference. Copenhagen, Denmark. pp. 285-290.
- Nguyen H, Xuan H, Dang T, Tsuzuki E, Mitsuhiro M, Ogushi Y. (2002). Evaluation of the allelopathic potential of Kava (*Piper methysticum* L.) for weed control in rice. *Weed Biology and Management* **2**, 143-147.
- Ni H, Moody K, Robles RP, Paller EC Jr, Lales JS (2000). *Oryza sativa* plant traits conferring competitive ability against weeds. *Weed science* **48**, 200-204.
- Ni H, Robles RP, Moody K (2004) Analysis of competition between wet-seeded rice and barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) using a response-surface model. *Weed Science* **52**, 142-146.
- Nojiri H, Sugimori M, Yamane H, Nishimura Y, Yamada A, Shibuya N, Kodama O, Murofushi N, Omori T (1996) Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. *Plant Physiology* **110**, 387-392.
- Olofsdotter M (2001) Rice—a step toward use of allelopathy. *Agronomy Journal* **93**, 3-8.
- Olofsdotter M, Jensen LB, Courtois B (2002) Improving crop competitive ability using allelopathy. An example from rice. *Plant Breeding* **121**, 1-9
- Olofsdotter M, Navarez D, Rebulanan M, Streibig JC (2000) Weed-suppressing rice cultivars – does allelopathy play a role? *Weed Research* **39**, 441-454.
- Otomo K, Kanno Y, Motegi A, Kenmoku H, Yamane H, Mitsuhashi W, Oikawa H, Tohima H, Itoh H, Matsuoka M, Sassa T, Toyomasu T (2004) Diterpene cyclases

- responsible for the biosynthesis of phytoalexins, momilactones A, B, and oryzalexins A-F in rice. *Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry* **68**, 2001–2006.
- Pantone DJ, Baker JB (1991) Reciprocal yield analysis of red rice (*Oryza sativa*) competition in cultivated rice. *Weed Science* **39**, 42–47.
- Pantone DJ, Baker JB, Jordan PW (1992) Path analysis of red rice (*Oryza sativa* L.) competition with cultivated rice. *Weed Science* **40**, 313–319.
- Pheng S, Adkins S, Olofsdotter M, Jahn G (1999) Allelopathic effects of rice (*Oryza sativa* L.) on the growth of awnless barnyardgrass (*Echinochloa colona* (L.): A new form for weed management. *Cambodian Journal of Agriculture* **2**, 42–49.
- Pheng S, Olofsdotter M, Jahn G, Adkins SW (2009) Potential allelopathic rice lines for weed management in Cambodian rice production. *Weed Biology and Management* **9**, 259–266.
- Pisula NL, Meiners SJ (2010) Relative allelopathic potential of invasive plant species in a young disturbed woodland. *Journal of the Torrey Botanical Society* **137**, 81–87.
- Pretsch E, Clerc T, Seibl J, Simon W (1989) `Tables of spectral data for structure determination of organic compounds` (Springer Verlag: New York)
- Prisic S, Xu M, Wilderman PR, Peters RJ (2004) Rice contains two disparate ent-copalyl diphosphate synthases with distinct metabolic functions. *Plant Physiology* **136**, 4228–4236.
- Quintero CE (2010) Factores limitantes para el crecimiento y productividad del arroz en Entre Ríos, Argentina. Tesis Doctoral. Universidade da Coruña.
- Rajguru SN, Stewart JM, Shivrain VK, Burgos NR (2005) Mutations in the red rice ALS gene associated with resistance to imazethapyr. *Weed Science* **53**, 567–577.
- Rice EL (1984) Introduction. In `Allelopathy` (Ed. EL Rice) pp. 1–7. (Academic Press: Orlando, FL)
- Ricklefs, RE (1998) Invitación a la ecología. La economía de la naturaleza. (Médica Panamericana: Buenos Aires)
- Rimando AM, Olofsdotter M, Dayan FE Duke SO (2001) Searching for rice allelochemicals: an example of bioassay-guided isolation. *Agronomy Journal* **93**, 16–20.
- Seal AN, Haig T, Pratley JE (2004b). Evaluation of putative allelochemicals in rice root exudates for their role in the suppression of arrowhead root growth. *Journal of Chemical Ecology* **30**, 1663–1678.

- Seal AN, Pratley JE (2010) The specificity of allelopathy in rice (*Oryza sativa*). *Weed Research* **50**, 303-311.
- Seal AN, Pratley JE, Haig T, An M (2004a) Identification and quantitation of compounds in a series of allelopathic and non-allelopathic rice root exudates. *Journal of Chemical Ecology* **30**, 1647–1662.
- Serido H, Endo T, Suga R, Kodama O, Akatsuka T, Kono Y, Takeuchi S (1986) Oryzalexin D (3,7-Dihydroxy-(+)sandaracopimaradiene), a new phytoalexin isolated from blast-infected rice leaves. *Journal of Pesticide Science* **11**, 369-372.
- Singh HP, Batish D, Kohli RK (2006) Weeds and their management. In 'Handbook of Sustainable Weed Management'. (Eds. H Singh, D Batish, R Kohli) pp. 1-14. (Haworth Press: Binghamton, NY)
- Slaton NA (2004) 'Rice Production Handbook' (Eds. NA Slaton) (Cooperative Extension Service Print Media Center: Little Rock, AK)
- Soejima H, Sugiyama T, Ishihara K (1992) Changes in cytokinin activities and mass spectrometric analysis of cytokinins in root exudates of rice plant (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology* **100**, 1724–1729.
- Song B, Xiong J, Fang C, Qiu L, Lin R, Liang Y (2008) Allelopathic enhancement and differential gene expression in rice under low nitrogen treatment. *Journal of Chemical Ecology* **34**, 688–95.
- Song HK, Ahn JK, Ahmad A, Hahn SJ, Kim SH, Chung IM (2004) Identification of allelochemicals in rice root exudates at various phenological phases and their influence on barnyardgrass. *Allelopathy Journal* **13**, 173–188.
- Song Z, Li B, Chen J, Lu BR (2005) Genetic diversity and conservation of common wild rice (*Oryza rufipogon*) in China. *Plant Species Biology* **20**, 83-92.
- Souto C, Pellissier F, Chiapusio G (2000) Allelopathic effects of humus phenolics on growth and respiration of mycorrhizal fungi. *Journal of Chemical Ecology* **26**, 2015–2023.
- Tamogami S, Kodama O (2000) Coronatine elicits phytoalexin production in rice leaves (*Oryza sativa* L.) in the same manner as jasmonic acid. *Phytochemistry* **54**, 689-694.
- Teerarak M, Laosinwattana C, Charoenying P (2010) Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. *grandiflorum* (L.) Kob. on bioassay plants. *Bioresource Technology* **101**, 5677–5684.

- Tevini M, Braun J, Fieser G (1991) The protective function of epidermal layer of rye seedlings against ultraviolet-B radiation. *Photochemistry and Photobiology* **53**, 329-333.
- Toyomasu T, Kagahara T, Okada K, Koga J, Hasegawa M, Mitsuhashi W, Sassa T, Yamane H (2008) Diterpene phytoalexins are biosynthesized in and exuded from the roots of rice seedlings. *Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry* **72**, 562-567.
- Vandermeer H (1980) 'The ecology of intercropping'. (Cambridge University Press: Cambridge, UK)
- Vaughan L, Ottis BV, Prazak-Havey AM, Bormans CA, Sneller C, Chandler JM, Park WD (2001) Is all red rice found in commercial rice really *Oryza sativa*? *Weed Science* **49**, 468-476.
- Walpole R, Myers R, Myers L (1999) 'Probabilidad y estadística para ingenieros'. (Prentice Hall Hispanoamericana: México, DF).
- Weidenhamer JD, Hartnett DC, Romeo JT (1989). Density-dependent phytotoxicity: distinguishing resource competition and allelopathic interference in plants. *Journal of Applied Ecology* **26**, 613-624.
- Weston LA, Duke SO (2003) Weed and crop allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences* **22**, 367-389.
- Whittaker RH, Feeny PP (1971) Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science* **171**, 757-770.
- Wilderman PR, Xu M, Jin Y, Coates RM, Peters RJ (2004) Identification of syn-pimara-7,15-diene synthase reveals functional clustering of terpene synthases involved in rice phytoalexin/allelochemical biosynthesis. *Plant Physiology* **135**, 2098-2105.
- Wu H, Pratley J, Lemerle D, Haig T (1999). Crop cultivars with allelopathic capability. *Weed Research* **39**, 171-180.
- Xiong J, Jia XL, Deng JY, Jiang BY, He HB, Lin WX (2007) Analysis of epistatic effect and QTL interactions with environment for allelopathy in rice (*Oryza sativa* L.). *Allelopathy Journal* **20**, 259-268.
- Xuan TD, Eiji T, Hiroyuki T, Mitsuhiro M, Khanh TD, Chung I (2004). Evaluation of phytotoxicity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) to crops and weeds. *Crop Protection* **23**, 335-345.
- Xuan TD, Hong N, Khanh T, Eiji T, Tawata S, Fukuta M (2005) Utilization of plant allelopathy for biological control of weeds and plant pathogens in rice. The Fourth World Congress on Allelopathy. Wagga Wagga, Australia.

- Zamora-Meléndez A, González P, Espinoza AM (2003) Wild rice (Poaceae: *Oryza*) species of Costa Rica: diversity and distribution. *Genetic Resources Crop Evolution* **50**, 855-870.
- Zhao DL, Atlin GN, Bastiaans L, Spiertz JHJ (2006) Developing selection protocols for weed competitiveness in aerobic rice. *Field Crop Research* **97**, 272-285.